



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAYNAH VICARI

AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DAS NANOPARTÍCULA DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO₂), CHUMBO INORGÂNICO E ALUMÍNIO EM BIOENSAIOS TRÓFICOS COM *Hoplias intermedius* E APLICAÇÕES DO CULTIVO CELULAR PRIMÁRIO TRIDIMENSIONAL (CULTIVO CELULAR 3D) NOS ESTUDOS COM NANOPARTÍCULAS.

CURITIBA

2015

TAYNAH VICARI

AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DA NANOPARTÍCULA DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO₂), CHUMBO INORGÂNICO E ALUMÍNIO EM BIOENSAIOS TRÓFICOS COM *Hoplias intermedius* E APLICAÇÕES DO CULTIVO CELULAR PRIMÁRIO TRIDIMENSIONAL (CULTIVO 3D) NOS ESTUDOS COM NANOPARTÍCULAS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Margarete Cestari.

Co-orientador no exterior: Prof. Dr. Awadesh Jha

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Vicari, Taynah

Avaliação genotóxica da nanopartícula de dióxido de titânio (TiO₂), chumbo inorgânico e alumínio em bioensaios tróficos com *Hoplias intermedius* e aplicações do cultivo celular primário tridimensional (cultivo 3D) nos estudos com nanopartículas. / Taynah Vicari. – Curitiba, 2015. 243 f. ; 30cm.

Orientador: Marta Margarete Cestari

Co-orientador: Awadesh Jha

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Nanopartículas 2. Genotoxicidade 3. Dióxido de titânio 4. Chumbo 5. Alumínio I. Título II. Cestari, Marta Margarete III. Jha, Awadesh VI. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 575.131



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER


Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa de tese de doutorado, a qual se submeteu **TAYNAH VICARI**, para obtenção do título de Doutora em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se aprove a candidata.
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 29 de setembro de 2015


Doutor João Luiz Coelho Ribas
Universidade Positivo – Membro titular


Doutora Maritana Mela-Prodócimo
Universidade Federal do Paraná – Membro titular


Doutora Izonete Cristina Guiloski
Universidade Federal do Paraná – Membro titular


Doutora Daniela Morais Leme
Universidade Federal do Paraná – Membro titular


Doutora Marta Margarete Cestari
Universidade Federal do Paraná – Orientadora e presidente da Banca

Visto


Professora Doutora Lupe Furtado Alle
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

Aos meus avôs:

*Guerino Favero e
Laurindo Antônio Viccari*

(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Hoje é um dia especial. Dia em que encerro uma fase muito desejada da minha vida. Ela não teria sido possível de ser concluída se uma pessoa não tivesse confiado em mim. Prof^a. Dr^a. Marta Margarete Cestari, muito obrigada por toda a confiança, apoio, amizade e ajuda em momentos cruciais. Muito obrigada por todas as cobranças e puxões de orelha também. Espero que o doutorado termine, porém, a parceria profissional ainda dure por muitos anos.

Aos professores da banca de avaliação Dr^a. Izonete Cristina Guiloski, Prof^a. Dr^a. Maritana Mela, Prof^a. Dr^a. Daniela Morais Leme e Prof. Dr^o. João Ribas. Muito obrigada por terem aceitado o convite.

Aos professores do Departamento de Genética, Lupe, Erasto, Ricardo, Nina, Chirlei, Karam, Maria Luiza, Maria da Graça, Iglénir, Enilze, Ives, Valéria, Roseli, Vanessa, Marina, Íris, Ana Cláudia, Danon e Daniela Leme, por mais do que nos passarem ensinamentos, por fazerem parte deste momento tão importante em nossas vidas. A todos os outros professores com os quais o contato também foi muito proveitoso, em outras disciplinas: Prof^a. Helena Silva de Assis, Prof^a. Maritana Mela, Prof. Edvaldo Trindade, Prof^a. Célia Regina, Prof^a. Carolina, Prof. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro e Prof. Francisco Filipak Neto.

A Capes pela concessão das bolsas (no país e de doutorado sanduíche). Em especial, meu agradecimento ao Prof. Dr. Awadesh Jha, e ao meu segundo supervisor Matthew Baron e meu companheiro de aventuras, Richard Maunder. A todos os colegas do *ERIC* (Ecotoxicology Research and Innovation Center) meu mais profundo agradecimento por toda ajuda e a certeza de que nos encontraremos novamente: Laura Langan, Lorna Dallas, Lynne Cooper, Enrique Barón, Teresa Balbi, Deepu, Will Vevers, Rajan, Tamsin, Emily Vernon, Awantha, Abbas, Rebecca, Barbara e Sarah.

As mulheres do laboratório de Toxicologia Aquática, do Departamento de Farmacologia, chefiado pela Prof^a Dr^a Helena Silva de Assis. Muito obrigada especialmente à Leticia, a Camila e a Talitha, pelas análises bioquímicas e por dividirem as angústias de muito trabalho e várias análises.

À Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Furnas – Centrais Elétricas, principalmente ao gerente da unidade Sr. Dirceu, à bióloga Marília e todos os outros funcionários que nos ajudaram com os peixes utilizados nesta Tese. A todos que, de alguma maneira ajudaram com os experimentos, inclusive enviando outros peixes: aos meus tios (Clari e Sandra), ao Sr. Mauricio (pai da Tatiane) e ao “seu Coisinha” (Sr. Antônio), da

piscicultura Peixes e Peixes, por vender os lambaris-presa deste experimento. Aos meus “outros braços” durante os experimentos Laís, Helyandra, Ana Carolina, Tatiane e Priscila, pois sem vocês, eu tenho consciência de que este projeto não teria sido possível. Muito obrigada pela ajuda e pelo convívio.

Aos meus colegas de caminhada, Wanessa, Gabrieli e Laercio, sem vocês nada seria tão divertido. Laís, Juliana, Geonildo, Emanuele, Antônio e Gustavo: espero levá-los para sempre como amigos e como colegas de trabalho. A todos os meus amigos e colegas do Laboratório de Citogenética Animal, não apenas aqueles com quem convivi durante o doutorado, mas todos aqueles que nesses 10 anos e alguns meses contribuíram para a minha formação humana e profissional. Vocês são imprescindíveis para que o laboratório seja o que é.

Aos meus amigos da graduação, que por consequências da vida estão cada um em seu canto do mundo, porém estão sempre bem guardados no coração: Milenie, Nádia, Bianca, Manoela, Mayara, Elaine, Augusto, Andressa, José Vicente (Zé), Gustavo, Nicolle, Rodrigo (Caderno).

À secretaria do Departamento de Genética e ao secretário do PPGGEN, Murilo, e a todos os funcionários especialmente, Àurea e a dona Araci, ao Sebastião e ao Sr Luís pelas balinhas, pelo cardápio do RU e pelo bom dia de todas as minhas manhãs, muito obrigada por tornarem tudo mais leve.

Às minhas irmãs *Kauane* e *Maria Rita*, por me amarem incondicionalmente e por sempre estarem por perto, mesmo estando longe. Aos meus familiares que, apesar da distância, sei que torcem muito por mim.

Aos meus pais, *Sady* e *Nelcy*, por sempre torcerem e apoiarem a minha escolha profissional.

E principalmente *a Deus*: sua presença durante toda a minha vida sempre foi realmente visível, porém durante esta caminhada que se encerra hoje, gostaria de dizer que GRATIDÃO é a minha mais nova palavra favorita. Eu posso hoje não compreender por que tudo aconteceu da maneira como aconteceu, mas acredito plenamente que, um dia, ao olhar para trás, terei a consciência de que tudo valeu a pena. Muito obrigada por tudo.

*“É que tem mais chão nos meus olhos
do que cansaço nas minhas pernas,
mais esperança nos meus passos do
que tristeza nos meus ombros, mais
estrada no meu coração, do que medo
na minha cabeça.”*

Cora Coralina

RESUMO

O presente trabalho teve como principal objetivo investigar os efeitos das nanopartículas metálicas utilizando como modelo de estudo a espécie *Hoplias intermedius*, um peixe de água doce, endêmico da região Neotropical. Esta espécie de peixe é fonte importante de proteínas para as populações ribeirinhas. Além disso, esta espécie é carnívora e facilmente adaptada em laboratório, o que a torna importante para estudos de contaminação via dieta. Desta forma, o primeiro estudo foi realizado para verificar o efeito das nanopartículas de dióxido de titânio isoladas e quando associadas ao metal chumbo. Para esta abordagem, utilizaram-se alguns biomarcadores de estresse oxidativo, biomarcadores de biotransformação, alteração em macromoléculas além da verificação de danos genotóxicos, como a utilização do ensaio do cometa, realizado para o sangue e para outros tecidos, ensaio de difusão do DNA e o teste do micronúcleo píceo. O segundo capítulo desta tese conta com a utilização dos mesmos biomarcadores bioquímicos e genéticos, porém neste caso, o metal utilizado para o estudo da exposição associada destas nanopartículas foi o metal alumínio. Neste capítulo, é possível observar uma menor toxicidade do metal alumínio e as diferenças encontradas para as análises de efeito quando os compostos participam juntos do processo de exposição. Após conhecer as respostas celulares *in vivo*, realizou-se um estudo *in vitro* para investigar os efeitos e a internalização celular, neste caso, de diferentes tipos de nanopartículas de prata (AgNPs), em um modelo de cultivo celular de hepatócitos de truta arco íris (*Onchorhynchus mykiss*) em 3-D. Para tanto, o terceiro capítulo está relacionado a um estágio de doutorado sanduíche realizado na Universidade de Plymouth – Reino Unido, com o objetivo de estudar a cinética de absorção de diferentes nanopartículas de prata, bem como a existência de efeitos tóxicos utilizando a microscopia eletrônica de transmissão bem como alguns ensaios bioquímicos. Os resultados obtidos ao longo deste documento são provenientes de diferentes metodologias, no entanto, convergem demonstrando os efeitos adversos de poluentes aquáticos nos organismos expostos, e nas células, bem como a dificuldade em se trabalhar com diferentes tipos de nanomateriais.

Palavras chave: nanomateriais, nanogenoecotoxicidade, peixes, biomarcadores genéticos, biomarcadores bioquímicos, ensaio cometa, estresse oxidativo.

.

ABSTRACT

The main objective of this work was to investigate the effects of metallic nanoparticles using the species *Hoplias intermedius*, a freshwater fish, endemic to the Neotropical region. This species is an important source of protein for riverine populations. In addition, this species is carnivorous and easily adapted in the laboratory, which makes it important for studies of contamination through diet. Thus, the first study was carried out to verify the effect of isolated titanium dioxide nanoparticles and when associated with lead. For this approach, we used some biomarkers of oxidative stress, biomarkers of biotransformation, alteration in macromolecules in addition to the verification of genotoxic damages, such as the use of the comet assay, performed for blood and other tissues, DNA diffusion assay and the piscine micronucleus test. The second chapter counts on the use of the same biochemical and genetic biomarkers; however in this case, the metal used to study the associated exposure of these nanoparticles was aluminum. In this chapter, it is possible to observe lower aluminum toxicity and the differences found for the effect when the compounds participate together in the exposure process. After verified the cellular responses *in vivo*, an *in vitro* study was carried out to investigate the effects of different types of silver nanoparticles (AgNPs), and their cellular internalization, in a cellular tridimensional mode (3D) of rainbow trout hepatocytes (*Oncorhynchus mykiss*). To do so, the third chapter is related to a PhD stage held at the University of Plymouth - UK, with the objective of studying the kinetics of absorption of different silver nanoparticles, as well as the existence of toxic effects using the electron microscopy of as well as some biochemical assays. The results obtained throughout this document come from different methodologies, however, converge demonstrating the adverse effects of aquatic pollutants on exposed organisms, and in cells, as well as the difficulty in working with different types of nanomaterials.

Keywords: nanomaterials, nanogenoecotoxicity, fish, genetic biomarkers, biochemical biomarkers, comet assay, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA REPRESENTANDO A HIDRÓLISE DA ACETILCOLINA, O MEDIADOR QUÍMICO NECESSÁRIO PARA A TRANSMISSÃO DO IMPULSO NERVOSO.	8
FIGURA 2 - REAÇÃO MOSTRANDO ATIVIDADE DO CITOCROMO P ₄₅₀ SOBRE A 7-ETÓXI-RESORUFINA.	12
FIGURA 3: ETAPAS DA REAÇÃO DE LIPOPEROXIDAÇÃO.	16
FIGURA 4 - EXEMPLOS DE ERITRÓCITOS COM ALTERAÇÕES NUCLEARES ENCONTRADOS NOS EXEMPLARES (a, b, c, d, e, f, g, h, i), BEM COMO A PRESENÇA DE ERITRÓCITOS COM NÚCLEOS NORMAIS (j).	21
FIGURA 5 - EXEMPLOS DE ERITRÓCITOS NORMOCROMÁTICOS (MADUROS) COM ALTERAÇÕES NUCLEARES ENCONTRADOS NOS EXEMPLARES (a, b, c, d, e, f, g, h, i), BEM COMO A PRESENÇA DE ERITRÓCITOS COM NÚCLEOS NORMAIS (j).	22
FIGURA 6 - EXEMPLOS DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS (IMATUROS), COM ALTERAÇÕES NUCLEARES ENCONTRADOS NOS EXEMPLARES BEM COMO A PRESENÇA DE ERITRÓCITOS COM NÚCLEOS NORMAIS (a, b, c, d, e, f, g, h, i), (j). .	22
FIGURA 7 - EXEMPLAR DA ESPÉCIE <i>Hoplias intermedius</i> UTILIZADO NESTE ESTUDO.	53
FIGURA 8 - CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE DIÓXIDO DE TITÂNIO. (A) GRÁFICO COM INFORMAÇÕES SOBRE O TAMANHO MÉDIO DAS NANOPARTÍCULAS DE TiO ₂ EM PÓ. (B) ELETROMICROGRAFIAS DAS NANOPARTÍCULAS DE TiO ₂ : “1A” E “2A” EM ESCALA DE 100 nm E EM “1B” E “2B” EM ESCALA DE	73
FIGURA 9 - GRÁFICO QUE MOSTRA OS PICOS DE INTENSIDADE RELATIVOS AO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS, CAPTURADOS PELO APARELHO ZETA SIZER®.	74

FIGURA 10 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) CEREBRAL EM *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA. Pb: CHUMBO (21 mg/g); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Pb+0.1 NP), 1 µg/g (Pb+1 NP), 10 µg/g (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($P < 0,05$). 76

FIGURA 11 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) MUSCULAR EM *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE: Pb: CHUMBO (21 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Pb+0.1 NP), 1 µg/g (Pb+1 NP), 10 µg/g (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS. 78

FIGURA 12 - ATIVIDADE DA GST EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. Pb: CHUMBO (21 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Pb+0.1 NP), 1 µg/g (Pb+1 NP), 10 µg/g (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS. 80

FIGURA 13 - PRESA (*Astyanax* sp.) DE *Hoplias intermedius* RECEBENDO A INJEÇÃO DO CONTAMINANTE RELATIVO AO PESO DO PEIXE PREDADOR 127

FIGURA 14 - EXEMPLAR DE *Hoplias intermedius* SENDO ALIMENTADO DURANTE O PROCESSO DE EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES. 128

FIGURA 15 - CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE DIÓXIDO DE TITÂNIO. (A) GRÁFICO COM INFORMAÇÕES SOBRE O TAMANHO MÉDIO DAS NANOPARTÍCULAS DE TiO_2 EM PÓ. (B) ELETROMICROGRAFIAS DAS NANOPARTÍCULAS DE TiO_2 : “1a” E “2a” EM ESCALA DE 100 nm E EM “1b” e “2b” EM ESCALA DE 50 nm. 136

FIGURA 16 - GRÁFICO QUE MOSTRA OS PICOS DE INTENSIDADE RELATIVOS AO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS, CAPTURADOS PELO APARELHO ZETA SIZER®. 137

FIGURA 17 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) CEREBRAL EM *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA. Al: ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Al+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Al+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS. 140

FIGURA 18 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) MUSCULAR EM *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA. Al: ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Al+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Al+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS. 142

FIGURA 19 - ATIVIDADE DA GST EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. Al: ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Al+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Al+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$

(0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA $p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS. 143

FIGURA 20 - ATIVIDADE DA EROD EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. AL: ALUMÍNIO (50 MG/G); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+1 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($P < 0,05$). 145

FIGURA 21 - ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. AL: ALUMÍNIO (50 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($p < 0,05$). 147

FIGURA 22 - ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE (CAT) EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. AL: ALUMÍNIO (50 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($p < 0,05$). 148

FIGURA 23 - AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. AL: ALUMÍNIO (50 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE

TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($p < 0,05$)..... 150

FIGURA 24 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS (MTs) EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. Al: alumínio (50 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($p < 0,05$)..... 152

FIGURA 25 - NÚMERO DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES E MICRONÚCLEOS EM ERITRÓCITOS DE *Hoplias intermedius*. Al: ALUMÍNIO (50 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS..... 154

FIGURA 26 - DANOS AO DNA DE ERITRÓCITOS DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. Al: ALUMÍNIO (50 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($P < 0,05$). 157

FIGURA 27 - DANOS AO DNA DAS BRÂNKUIAS DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. Al: ALUMÍNIO (50 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($p < 0,05$)..... 159

FIGURA 28 - DANOS AO DNA DO FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA. Al: ALUMÍNIO (50 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($p < 0,05$). 160

FIGURA 29 - DANOS AO DNA DO RIM POSTERIOR DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. Al: ALUMÍNIO (50 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS. 162

FIGURA 30 - DANOS AO DNA ENCONTRADOS NO CÉREBRO DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. Al: ALUMÍNIO (50 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS. 163

FIGURA 31 - FREQUÊNCIA DE APOPTOSE ENCONTRADA EM ERITRÓCITOS DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA. Al: ALUMÍNIO (50 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS. 165

FIGURA 32 - FREQUÊNCIA DE APOPTOSE ENCONTRADA EM CÉLULAS DO FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA. Al: ALUMÍNIO (50 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS. 166

FIGURA 33 - RESULTADOS OS PROCESSOS DE CARACTERIZAÇÃO (EM SEQUÊNCIA DLS, PALS E UV-VIS) PARA AS DUAS AgNPs, EM MEIO L-15+ 10% SBF. LEGENDA: AgNP@PVP TRATA-SE DA NANOPARTÍCULA DE PRATA ADQUIRIDA DA EMPRESA SIGMA ALDRICH®, ENQUANTO QUE AgNP@Salk, TRATA-SE DA NANOPARTÍCULA DE PRATA PRODUZIDA PELA UNIVERSIDADE DE NOTTINGHAM..... 200

FIGURA 34 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PARA AS DUAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZADAS NESTE EXPERIMENTO. EM (A), A AgNP ADQUIRIDA DA EMPRESA SIGMA ALDRICH, QUANDO COLOCADA EM SUSPENSÃO EM MEIO L-15+10% SBF (ESCALA DE 200 nm). EM (B), A AgNP PRODUZIDA PELA UNIVERSIDADE DE NOTTINGHAM, QUANDO COLOCADA EM SUSPENSÃO EM MEIO L-15+10% SBF (ESCALA DE 50 nm). 200

FIGURA 35 – IMAGENS DA SUPERFÍCIE DOS ESFEROIDES DE HEPATÓCITOS DE TRUTA ARCO-ÍRIS UTILIZADOS NESTE EXPERIMENTO PARA CADA UM DOS GRUPOS EXPOSTOS, ADQUIRIDAS POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET). EM (A) IMAGEM DE UM ESFEROIDE PERTENCENTE AO GRUPO CONTROLE NEGATIVO. EM (B) IMAGEM DE ESFEROIDE PERTENCENTE AO GRUPO EXPOSTO AO NITRATO DE PRATA (AgNO_3). EM (C) IMAGEM DE UM ESFEROIDE PERTENCENTE AO GRUPO EXPOSTO ÀS AGNPS ADQUIRIDAS DA EMPRESA SIGMA ALDRICH[®] E EM (D) IMAGEM DE UM ESFEROIDE PERTENCENTE AO GRUPO EXPOSTO ÀS AgNPs PRODUZIDAS NA UNIVERSIDADE DE NOTTINGHAM.....201

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - PROJETOS DE LEI APRESENTADO NO CONGRESSO NACIONAL COM O OBJETIVO DE LEGISLAR SOBRE AS NANOTECNOLOGIAS. FONTE: SITE CÂMARA DOS DEPUTADOS, PUBLICADO EM 2013. 40
- TABELA 2** - CARACTERÍSTICAS AVALIADAS PELO APARELHO ZETA SIZER®, DAS TRÊS SUSPENSÕES COLOIDAIAS DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,01 mg/mL; 0,1 mg/mL e 1 mg/mL..... 74
- TABELA 3** - QUANTIFICAÇÃO DE CHUMBO NO TECIDO MUSCULAR DE *Hoplias intermedius*, NO GRUPO CONTROLE, BEM COMO NOS GRUPOS EXPOSTOS AO CHUMBO (21 µg/g) E À ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Pb+0.1 NP), 1 µg/g (Pb+1 NP), 10 µg/g (Pb+10 NP). LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS. 75
- TABELA 4** - FREQUÊNCIA MÉDIA DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES EM ERITRÓCITOS DE *Hoplias intermedius*, SEPARADAS ENTRE MICRONÚCLEO, BINÚCLEO, BLEBBED, LOBED, NOTCHED, VACUOLATED E TOTAL DE AMN. COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES CONJUNTOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA. VALORES EXPRESSOS EM MÉDIA E ERRO PADRÃO. A PRESENÇA DE ASTERISCO INDICA DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS E O CONTROLE. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS, APENAS. 91
- TABELA 5** - CARACTERÍSTICAS AVALIADAS PELO APARELHO ZETA SIZER®, DAS TRÊS SUSPENSÕES COLOIDAIAS DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,01 mg/mL; 0,1 mg/mL E 1 mg/mL. 137
- TABELA 6** - QUANTIFICAÇÃO DO ALUMÍNIO NO TECIDO MUSCULAR DE *Hoplias intermedius*, NO GRUPO CONTROLE, BEM COMO NOS GRUPOS EXPOSTOS AO ALUMÍNIO (50 µg/g) E À ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10 NP). 138
- TABELA 7** - FREQUÊNCIA MÉDIA DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES EM ERITRÓCITOS DE *Hoplias intermedius*, SEPARADAS ENTRE MICRONÚCLEO, BINÚCLEO, BLEBBED, LOBED, NOTCHED, VACUOLATED E TOTAL DE AMNs. COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES CONJUNTOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA. VALORES EXPRESSOS EM MÉDIA E ERRO PADRÃO. A PRESENÇA DE ASTERISCO INDICA DIFERENÇA ENTRE OS TRATAMENTOS ($p < 0,05$). 155

LISTA DE ABREVIATURAS

%	-Percentual
µg	-Micrograma
µm	-Micrometro
Ag	Prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
Al	-Alumínio
Ca	-Cálcio
CAT	-Catalase (s)
Cd	-Cádmio
cm	-Centímetro
cm ³	-Centímetro cúbico
Co	-Cobalto
Cu	-Cobre
Da	-Daltons
EDTA	-Ácido etileno diamino tetracético (do inglês <i>Ethylenediaminetetracetic Acid</i>)
ERO(s)	-espécie (s) reativa (s) de oxigênio
EROD	-etoxiresorufina- o- deetilase
Fe	-Ferro
g	-Grama
G6PDH	-glucose-6-fosfato desidrogenase
GP	-glutathione peroxidase
GR	-glutathione reductase
GSH	-glutathione
GST	-glutathione S-transferase (s)
H ₂ O ₂	-Peróxido de Hidrogênio
Hg	-Mercúrio
Kg	-Quilograma
L	-Litro
LPO	-peroxidação lipídica (do inglês <i>lipid peroxidation</i>)
m	-Metro

mA	-miliampere
MET	-microscopia eletrônica de transmissão
min	-minuto
ml	-mililitro
Mn	-Manganês
Mo	-Molibdênio
ng	-Nanograma
Ni	-Níquel
nM	-Nanomolar
NP(s)	-nanopartícula (s)
O_2^-	-(radical) ânion superóxido
°C	-graus Celsius
Pb	-Chumbo
PBS	-Tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate buffer saline</i>)
pH	-Potencial de Hidrogênio Iônico
S	-Enxofre
SOD	-Superóxido dismutase
Sn	-Estanho
TiO ₂	-Dióxido de titânio
V	-Volt
Zn	-Zinco

LISTA DE SIGLAS

AC	-	Aberrações Cromossômicas
CAS	-	Chemical Abstract Service.
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
EUA	-	Estados Unidos da América
FAO	-	Food and Agriculture Organization
HPA		Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IARC	-	International Agency for Research on Cancer
IUPAC	-	International Union of Purê and Applied Chemistry
LMP	-	Low melting point
MN	-	Micronúcleos
NER	-	Nucleotide Excision Repair
ONU	-	Organização das Nações Unidas
OSHA	-	Occupational Safety and Health Administration
SCE	-	Sister Chromatid Exchange
TEMS	-	Terrestrial Ecosystems Monitoring Sites
USEPA	-	United States Environmental Protection Agency
WHO	-	World Health Organization

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIX
LISTA DE SIGLAS.....	XXI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 CONCEITOS EM ECOTOXICOLOGIA.....	2
2.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	7
2.2.1 Biomarcador de Neurotoxicidade.....	7
2.2.2 Biomarcadores de estresse oxidativo.....	9
2.2.3 Biomarcadores de Biotransformação.....	10
2.2.4. Danos em macromoléculas.....	15
2.2.5 Biomarcadores genéticos.....	16
2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS METAIS	28
2.3.1 O chumbo	29
2.3.2 O alumínio	33
2.4 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	38
2.4.1 Nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO ₂)	41
2.4.2 Nanopartículas de prata (AgNPs).....	45
2.4.3 Associação entre nanopartículas e metais	50
2.5 ASPECTOS SISTEMÁTICOS E ECOLÓGICOS DE <i>HOPLIAS INTERMEDIUS</i>	52
2.6 O USO DE CÉLULAS DE PEIXES NO ESTUDO DE ECOTOXICOLOGIA	54
3. OBJETIVOS	57
3.1 OBJETIVO GERAL.....	57
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
CAPÍTULO I	59
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA DAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO₂) E CO-EXPOSIÇÃO COM O CHUMBO INORGÂNICO (PBII), NA ESPÉCIE DE PEIXE NEOTROPICAL <i>HOPLIAS INTERMEDIUS</i>, UTILIZANDO BIOMARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS.....	59
RESUMO	60
INTRODUÇÃO	61
MATERIAL E MÉTODOS	63
RESULTADOS	72
DISCUSSÃO.....	102
CONCLUSÃO	119
CAPÍTULO II.....	120
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA DAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO₂) E QUANDO EM ASSOCIAÇÃO COM O ALUMÍNIO	

(AL), NA ESPÉCIE DE PEIXE NEOTROPICAL <i>HOPLIAS INTERMEDIUS</i>, UTILIZANDO BIOMARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS.....	120
RESUMO	121
INTRODUÇÃO	122
MATERIAL E MÉTODOS	125
RESULTADOS	135
DISCUSSÃO	167
CONCLUSÃO	184
CAPÍTULO III	185
INTERNALIZAÇÃO CELULAR E COMPORTAMENTO DE DIFERENTES NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DO ÍON Ag^+, UTILIZANDO CULTIVO CELULAR 3D DE HEPATÓCITOS DE TRUTA ARCO ÍRIS (<i>ONCHORYNCHUS MYKISS</i>).	185
RESUMO	186
INTRODUÇÃO	187
OBJETIVO	192
MATERIAL E MÉTODOS	192
RESULTADOS	199
DISCUSSÃO	202
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	204
REFERÊNCIAS	206

1. INTRODUÇÃO

Após a Revolução Industrial, a capacidade de produção e de combinação de diversos elementos químicos entre si, pelo homem, para os mais diversos fins, sofreu um aumento exponencial. Deste modo, o ambiente aquático é um dos ecossistemas que passou a sofrer mais com os impactos causados pela ação antropogênica, uma vez que constituem os compartimentos finais de vários produtos gerados através da atividade humana. Os despejos de esgotos industriais e domésticos, juntamente com a grande quantidade de agrotóxicos utilizada na agricultura, bem como o crescente número de acidentes que envolvem o derrame de derivados do petróleo, materiais plásticos, a presença silenciosa de fármacos, nanomateriais, retardantes de chama e desreguladores endócrinos, contribuem para a geração de produtos persistentes que podem afetar de forma irreversível este ecossistema.

Consequentemente, a partir do mesmo período, porém mais evidentemente nas últimas décadas, têm aumentado o interesse da população, bem como da comunidade científica e das agências regulatórias em relação à detecção, conhecimento e controle aos agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e a sustentabilidade dos ecossistemas. Devido à entrada dessas substâncias no ambiente, via corpos d'água, solo e ar, porém principalmente no ambiente aquático, onde comumente, elas mais se concentram, existe uma grande possibilidade de que estas substâncias, devido a características próprias, estejam se fixando nos indivíduos que compõem as cadeias tróficas.

Com a presença de inúmeras substâncias, nos mais diversos ecossistemas, vários estudos têm sido realizados com o intuito de compreender como agem os elementos e as substâncias químicas nestes ecossistemas, por quanto tempo permanecem no ambiente e quais seriam seus destinos prováveis, bem como suas interações com os seres vivos e seus efeitos sobre estes. Estas substâncias, com quantidades e variedades em contínuo crescimento são chamadas de “xenobióticos”, por se tratarem de substâncias estranhas ao ambiente (LIVINGSTONE, 1993; 1998). Um grande número de estudos tem sido realizado na tentativa de se examinar e determinar o impacto de um amplo número de xenobióticos em vários aspectos individuais de invertebrados e peixes. Porém, mais rapidamente cresce o número de substâncias produzidas e utilizadas pelo homem, fazendo com que os estudos sobre a citotoxicidade, genotoxicidade e outras perturbações metabólicas causadas por essas substâncias e elementos químicos, sejam de grande importância, pois permitem determinar as respostas de um dado organismo à contaminação por estes, bem como avaliar o impacto e o efeito destes sobre células, tecidos e órgãos, e ainda inferir sobre possíveis consequências para as espécies e para os ecossistemas (LAWRENCE e ELLIOT, 2003). Os padrões de

acumulação de xenobióticos são distintos para diferentes organismos e dependem do balanço entre a taxa de assimilação e as taxas de metabolização e eliminação dos compostos químicos. Além disso, a manifestação dos efeitos tóxicos depende da dose e da forma química em que estes se encontram, podendo distribuir-se por todo o organismo, afetando vários órgãos e alterando os processos bioquímicos e a fisiologia celular.

No princípio dos estudos toxicológicos de xenobióticos, os pesquisadores preferencialmente utilizaram métodos de quantificação de contaminantes tanto em amostras ambientais, quanto em tecidos animais, na tentativa de se elucidar o mecanismo de toxicidade dos contaminantes mais encontrados no meio ambiente. Posteriormente, com o avanço da ecotoxicologia, a necessidade de desvendar potenciais efeitos à saúde humana, causados por compostos químicos, modificou o objetivo desta ciência emergente, que passou então a utilizar espécies selvagens como sentinelas para os problemas ambientais (BICKHAM *et al.*, 2000).

Portanto, com relação ao ambiente aquático, os peixes são organismos que fornecem um modelo adequado para o monitoramento da genotoxicidade aquática da qualidade das águas residuais, devido à sua capacidade de metabolizar xenobióticos e acumular poluentes (GRISÓLIA e CORDEIRO, 2000). Além disso, os peixes atuam em diversos níveis da cadeia trófica, respondem à presença de mutágenos em baixas concentrações, além de serem capazes de ativar o sistema enzimático do citocromo P450. Este sistema enzimático é responsável por catalisar reações de monooxigenases, envolvendo oxigênio molecular e um número equivalente de elétrons. Estas enzimas estão envolvidas na desintoxicação de compostos químicos lipofílicos, de origem endógena (hormônios esteroides, ácidos graxos, vitaminas) e exógena (drogas, carcinógenos químicos, poluentes ambientais) (UNO *et al.*, 2012).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONCEITOS EM ECOTOXICOLOGIA

O termo ecotoxicologia foi utilizado pela primeira vez por Truhaut em 1969, como uma extensão natural da toxicologia: a ciência que estuda os efeitos de substâncias tóxicas em organismos, bem como os efeitos ecológicos de poluentes ambientais. Com o passar do tempo, esta definição de ecotoxicologia sofreu mudanças que ampliaram sua utilização e hoje pode ser definida como a ciência que avalia os efeitos de substâncias tóxicas nos

ecossistemas, com o objetivo de protegê-los, e não apenas a avaliação de compostos de forma isolada. Com o surgimento deste novo campo de estudo, algumas definições foram cunhadas na tentativa de organizar este novo conhecimento (ADAMS e ROWLAND, 2002).

Para se conhecer a ação tóxica dos xenobiontes, pode-se trabalhar com experimentos laboratoriais, que chamamos de bioensaios, ou estudos de campo, chamados de biomonitoramento. O biomonitoramento aquático é a realização de análises periódicas de corpos d'água, utilizando parâmetros químicos, físicos, bacteriológicos e organismos biomonitores, na tentativa de se avaliar a qualidade de águas e efluentes. Enquanto que uma análise apenas com os parâmetros químicos, físicos e bacteriológicos fornece uma resposta mais pontual acerca do corpo d'água em estudo, a realização de vários períodos de biomonitoramento fornece uma análise em longo prazo acerca da qualidade do corpo de água em estudo (KNIE e LOPES, 2004). Dados obtidos de programas de biomonitoramento são extremamente úteis na identificação local, regional e nacional de problemas ecotoxicológicos (ADAMS e ROWLAND, 2002), pois permitem uma avaliação mais ampla das condições naturais, apesar da existência de variáveis ambientais (como por exemplo, regime de chuvas, temperatura, salinidade, condutividade, dureza e pH) que dificultam a relação entre os resultados obtidos e os efeitos causados pelos contaminantes.

Os bioensaios permitem enfoques diversos como à obtenção de dados e a padronização de metodologias que possam prever ou avaliar os efeitos de determinadas substâncias. O uso de bioensaios em estudos de toxicologia é interessante, pois permitem o estudo dos efeitos tóxicos de determinados contaminantes nos organismos de forma isolada ou associados, minimizando a influência das variáveis ambientais e possibilitando o estudo da especificidade relativa de alguns efeitos dos contaminantes. Por outro lado, os resultados obtidos através de bioensaios não podem ser extrapolados diretamente para o ambiente, mas podem cooperar com uma base de dados que venha a ajudar a entender os fatores que estão interferindo na saúde dos organismos, e/ou alterando as condições do próprio ambiente em que vivem. Dessa forma, a existência de estudos de áreas impactadas juntamente com informações provenientes de bioensaios geram dados para a toxicologia ambiental, permitindo uma melhor avaliação de áreas impactadas (AKAISHI, 2003).

Para a realização de bioensaios, pelas agências regulatórias, são utilizadas espécies mantidas em laboratório e cujos conhecimentos de sua biologia são suficientes para que possam ser utilizadas como indicadores de toxicidade dos efluentes, conhecidas como organismo-teste. Tanto a forma de cultivo como as metodologias e ensaios para estes organismos são definidos em normas técnicas, permitindo a reprodutibilidade dos resultados.

Além disso, estes organismos devem possuir uma relativa sensibilidade aos compostos presentes nos efluentes.

Utilizando os bioensaios, a toxicidade de águas e sedimentos pode ser testada, com o auxílio de sistemas biológicos como bactérias, leveduras e plantas, bem como com organismos aquáticos, como anfíbios, moluscos e peixes (MINISSI; CICCOTTI; RIZZONI, 1996). Ensaios com peixes possibilitam várias vias de administração da substância em estudo, quer seja através de alimentos (via-trófica), da água (via hídrica) ou até mesmo, injetando-se no animal (via intraperitoneal ou via circulação).

Os ensaios de toxicidade podem ser classificados pelo tempo de exposição, pela concentração utilizada no ensaio e pelo efeito observado. Podemos então, avaliar os efeitos dos contaminantes utilizando contaminações agudas ou crônicas. As contaminações agudas são testes de curta duração (geralmente entre 24h e 96h), designados a medir os efeitos dos contaminantes nas espécies aquáticas durante um curto período da vida do organismo. As contaminações crônicas são designadas para medir os efeitos dos xenobióticos em espécies aquáticas durante uma porção significativa, geralmente 10%, do ciclo de vida do organismo utilizado. Estudos crônicos avaliam os efeitos sub-letais dos contaminantes na reprodução, no crescimento, e no comportamento, devido a modificações fisiológicas, bioquímicas e genéticas, utilizando concentrações inferiores de contaminantes, por um período de exposição prolongado. Existem ainda as definições intermediárias, para a toxicidade subaguda e subcrônica, que são extremamente controversas devido ao intervalo de tempo que as caracteriza. Usualmente, esses estudos fornecem informações sobre alguns efeitos tóxicos observados, os órgãos alvo afetados e a intensidade dos efeitos após exposições repetidas, além de permitir a inferência das doses a serem utilizadas nos estudos de toxicidade crônica (AZEVEDO e CHASIN, 2004).

Deve-se ressaltar ainda que, devido à variedade de possíveis efeitos de um xenobionte, um teste isolado não é suficiente para avaliar a atuação deste sobre um ser vivo. Os ensaios aquáticos de toxicidade por via hídrica podem ainda ser classificados em: estáticos, semi-estáticos e de fluxo contínuo. Os testes estáticos de toxicidade são ensaios nos quais a água ou o contaminante não sofre o processo de renovação durante o período de exposição. Esse tipo de teste é mais frequentemente associado com testes agudos. Já os testes semi-estáticos, também conhecidos como testes estáticos com renovação, são testes que devem ser realizados com a troca do contaminante e da água de diluição periodicamente (geralmente diariamente ou a cada 48h) dependendo do tempo total do experimento. Esses dois tipos de ensaios descritos não são apropriados se o composto testado for instável, aderente às paredes dos

frascos, possuir alta volatilidade, ou tiver uma alta demanda por oxigênio. Quando uma dessas situações ocorrer, o sistema de fluxo contínuo é mais recomendado. Este sistema seria ideal nestes casos, pois ele seria responsável por repor o contaminante e a água de diluição de uma maneira contínua ou em intervalos regulares. Além disso, é considerado superior que os outros sistemas descritos, pois é um sistema muito mais eficiente na manutenção da qualidade da água, porém apresenta um custo mais elevado para sua aplicação (ADAMS e ROWLAND, 2002).

Os organismos que são utilizados em estudos ecotoxicológicos são conhecidos como organismos bioindicadores, ou seja, espécies sentinelas que serão utilizadas como primeiros indicadores de efeito do estresse causado por contaminantes nos mais altos níveis de organização entre os seres vivos (ADAMS, 2002). Um bioindicador é definido como sendo um organismo capaz de dar informações sobre as condições ambientais de seu habitat, por sua presença ou ausência, ou pelo seu comportamento, e sendo ele um indicador ecológico, como um parâmetro do ecossistema, ajudando na estrutura e no funcionamento dos mesmos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Consequentemente, o uso de organismos endêmicos como sentinelas ambientais será sempre preferível ao uso de espécies exóticas. Entretanto, para que este objetivo seja alcançado de maneira eficiente, o organismo endêmico eleito para este fim deve ser submetido a ensaios suficientemente sensíveis com a finalidade de ser estabelecido um padrão de resposta aos agentes testados (PANDRANGI *et al.*, 1995).

Os bioindicadores podem pertencer aos mais variados níveis tróficos, porém quanto maior o nível trófico ocupado por eles, mais relevante serão os resultados gerados em termos de acúmulos e efeitos de xenobióticos. Um organismo bioindicador ideal deve apresentar uma resistência relativa aos contaminantes a que será exposto, porém deve viver em ambientes saudáveis, além de ser abundante no ambiente e não apresentar riscos de extinção, bem como possuir uma relativa facilidade em adaptar-se aos ensaios em laboratório (SANCHEZ - GALAN, LINDE, GARCIA-VAZQUEZ, 1999).

O impacto de substâncias tóxicas na integridade e no funcionamento dos indivíduos bioindicadores tem sido muito investigado, em diferentes condições (McCARTHY e SHUGART, 1990). Principalmente devido ao conhecimento prévio de que os contaminantes são capazes de provocar respostas biológicas em organismos expostos, técnicas baseadas no uso de biomarcadores são constantemente utilizadas na avaliação de mudanças, induzidas por compostos tóxicos, em níveis biológicos e ecológicos (ADAMS e ROWLAND, 2002). Biomarcadores são definidos como as medições em fluidos corporais, tecidos ou células de

origem que indicam a presença de modificações celulares ou bioquímicas, devido à presença e magnitude dos poluentes, ou em resposta a algum hospedeiro (ADAMS e ROWLAND, 2002)

Segundo Van der Oost, Beyer e Vermeulen (2003), biomarcadores podem ser classificados como:

- (a) *Biomarcadores de efeito*, que constituem parâmetros mensuráveis em compartimentos celulares que permitem inferir efeitos prejudiciais ou adversos aos organismos; como por exemplo, a indução das enzimas CYP1A1 e CYP1A2 do citocromo P450 na presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.
- (b) *Biomarcadores de exposição*, pelos quais é possível detectar e/ou quantificar a presença do xenobionte, seus metabólitos ou sua associação a componentes celulares ou moleculares do organismo; como a detecção de metabólitos na bile em animais expostos a HPAs.
- (c) *Biomarcadores de susceptibilidade*, que indicam uma herança ou uma habilidade adquirida de um organismo em resposta a um desafio de uma exposição a um xenobionte específico, incluindo fatores genéticos e mudanças em receptores que alteram a susceptibilidade de um organismo à exposição.

Os biomarcadores são considerados uma ferramenta indispensável nos programas de monitoramento, pois apresentam características altamente importantes, como por exemplo, grande susceptibilidade, boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise (STEGEMAN *et al.*, 1992; BAINY, 1993). A análise desses parâmetros permite que ocorra: (1) uma detecção precoce da existência de contaminação por substâncias tóxicas e biologicamente significativas, (2) identificação de espécies ou populações em risco de contaminação, (3) magnitude da contaminação e, o que é mais importante, (4) determinação do grau de severidade dos efeitos causados pelos compostos xenobióticos (STEGEMAN *et al.*, 1992). No entanto, a grande discussão encontra-se no fato de que através do uso de biomarcadores pode-se encontrar uma grande variação de resposta, devido à variabilidade existente entre os indivíduos de uma mesma espécie. Além disso, certas respostas estabelecidas para uma espécie, não são necessariamente válidas para outras espécies (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) Entre as várias características que devemos considerar quanto à utilização de biomarcadores, estão o grau de especificidade e de sensibilidade do biomarcador com relação ao xenobionte, a variabilidade e a escala de tempo da resposta, bem como a relevância ecológica (ADAMS, 2002). Para uma melhor compreensão do que acontece com uma população que está sendo afetada por um ou vários contaminantes, deve-se primeiro entender os mecanismos básicos da ação destes em nível de organismo e de suborganismo.

2.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Os biomarcadores bioquímicos constituem os biomarcadores mais estudados, pois estão relacionados aos efeitos ocasionados nos indivíduos decorrentes de alterações ambientais ou doenças. Geralmente, as alterações bioquímicas podem ser consideradas marcadores tanto de exposição como de efeito (WALKER *et al.*, 1996). Neste caso, assim como para os biomarcadores genéticos, a análise de no mínimo dois biomarcadores ajuda a compreender o funcionamento do organismo frente à exposição a contaminantes. Usualmente, o estresse ocasionado pela exposição a diferentes substâncias, é responsável por ativar uma cascata de respostas biológicas, as quais podem ser consideradas, cada uma, como um biomarcador (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

2.2.1 Biomarcador de Neurotoxicidade

2.2.1.1 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

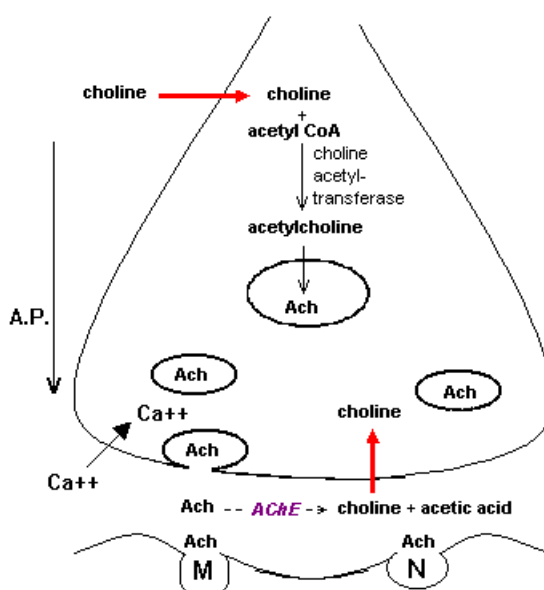
A enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético nas sinapses. A acetilcolina é o mediador químico necessário para transmissão do impulso nervoso nas fibras (a) pré e pós-ganglionares do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) simpático e parassimpático; (b) fibras parassimpáticas pós-ganglionares (órgãos efetores) e algumas fibras simpáticas pós-ganglionares (glândulas) (FIGURA 1). Ainda é o transmissor neuro-humoral (c) do nervo motor do músculo estriado (placa mioneural); e (d) de algumas sinapses interneurais do Sistema Nervoso Central (GALLO e LAWRYK, 1991, MORAES *et al.*, 1995, MORAES *et al.*, 1998).

Dois tipos de colinesterases de vertebrados são conhecidos: acetilcolinesterase (AChE), que possui uma alta afinidade por acetilcolina e butirilcolinesterase (BChE) ou esterases não específicas ou pseudocolinesterases, com afinidade por butirilcolina. As duas enzimas podem ser distinguidas funcionalmente com base na especificidade ao substrato e na diferente susceptibilidade aos seus inibidores. A principal função da AChE é a hidrólise da acetilcolina (ACh), o neurotransmissor da sinapse colinérgica do sistema nervoso. Esta enzima está envolvida na desativação da acetilcolina, na porção final dos neurônios e nervos,

prevenindo contra um estímulo nervoso contínuo, que é vital para a manutenção do sistema nervoso e sensorial (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003)

Em muitos peixes, o tecido cerebral contém predominantemente AChE. A BChE é encontrada, principalmente no soro, mas está presente também no fígado, músculo e outros tecidos. O músculo axial de peixes pode conter apenas AChE ou AChE e BChE (STURM *et al.*, 2000; MONTEIRO *et al.*, 2004).

FIGURA 1 - ESQUEMA REPRESENTANDO A HIDRÓLISE DA ACETILCOLINA, O MEDIADOR QUÍMICO NECESSÁRIO PARA A TRANSMISSÃO DO IMPULSO NERVOSO.



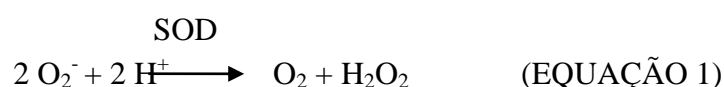
Fonte: <http://html.rincondelvago.com/colinergicos-y-bloqueadores.html>

A inibição da atividade da AChE tem sido utilizada em organismos aquáticos para diagnosticar exposição a agentes anticolinesterásicos como pesticidas organofosforados e carbamatos. Estudos recentes demonstram que as acetilcolinesterases são também sensíveis a outros tipos de contaminantes ambientais como metais, detergentes e misturas complexas de poluentes (VALE, 1998; PENÃ-LLOPIS *et al.*, 2003; FERRARI *et al.*, 2004; MONTEIRO *et al.*, 2004; SHAONAN *et al.*, 2004). Payne *et al.* (1996) sugere que misturas complexas de contaminantes devem ser considerados como fontes importantes na inibição da AChE em ambientes aquáticos. Porém, a maioria dos estudos é realizada com peixes de países que possuem clima temperado, e poucos são os estudos envolvendo a fauna Neotropical e a atividade da acetilcolinesterase.

2.2.2 Biomarcadores de estresse oxidativo

2.2.2.1 Superóxido dismutase (SOD)

As enzimas superóxido dismutase são um grupo de metaloenzimas responsáveis por catalisar a reação de dismutação, ou seja, a conversão de ânions superóxidos reativos ($\bullet\text{O}_2^-$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que também é uma espécie reativa de oxigênio muito importante (EQUAÇÃO 1):



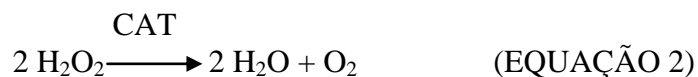
H_2O_2 será, na sequência, desintoxicada por duas enzimas: catalase (CAT) e glutationala peroxidase (GPx). Apesar de a SOD atuar sobre o ânion superóxido, evitando que este cause danos, o produto desta reação, o H_2O_2 , também é sabidamente conhecido por causar danos a nível celular, pois se trata também de uma espécie reativa de oxigênio, capaz de entrar nas células e alterar enzimas celulares importantes (ATLI *et al.*, 2006).

A superóxido dismutase é considerada de fundamental importância no mecanismo antioxidante, facilmente verificada pela presença em todos os organismos aeróbicos (STEGEMAN *et al.*, 1992). A maioria das técnicas utilizadas para a mensuração da atividade da SOD são ensaios indiretos que indicam a competição do *scavenger* com a SOD endógena por $\bullet\text{O}_2^-$. Uma unidade de atividade de SOD é definida como a quantidade que causa 50% de inibição da redução do *scavenger* sob condições específicas (STEGEMAN *et al.*, 1992). Uma significativa indução de SOD foi observada na maioria dos estudos de biomonitoramento, enquanto que estudos realizados em laboratório geralmente não apresentaram diferenças significativas em relação à atividade desta enzima.

2.2.2.2 Catalase (CAT)

As catalases são enzimas que facilitam a remoção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é metabolizado em oxigênio molecular (O_2) e água (EQUAÇÃO 2). Estas enzimas estão localizadas nos peroxissomos da maioria das células e estão envolvidas no metabolismo de

ácidos graxos e, por esta razão, mudanças em sua atividade podem ser difíceis de serem interpretadas (STEGEMAN *et al.*, 1992).



Um aumento da atividade de CAT hepática foi observado somente em peixes ambientalmente expostos a bifenilas policloradas (PCBs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), porém estudos realizados em laboratório não demonstraram nenhuma alteração significativa na atividade desta enzima. Do mesmo modo ao que ocorre com a enzima SOD, as respostas mais significativas para a CAT foram encontradas em estudos de biomonitoramento do que em estudos realizados em laboratório.

2.2.3 Biomarcadores de Biotransformação

Os organismos, de modo, geral, possuem dois mecanismos principais de eliminação de contaminantes: estes podem ser excretados em sua forma original (o que podemos chamar de composto parental) ou podem ser biotransformados pelo próprio organismo. Biotransformação geralmente leva à formação de compostos mais hidrofílicos que podem ser mais facilmente excretados que os compostos parentais (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). O órgão mais comumente envolvido com o processo de biotransformação de compostos exógenos é o fígado, principalmente devido à sua função, posição e irrigação sanguínea. Este processo pode ainda, alterar a toxicidade das substâncias, pois este pode ser benéfico ou danoso ao organismo. A importância deste processo está relacionada à determinação da atividade do composto, a duração dessa atividade e a meia vida do composto dentro do corpo do organismo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

O mecanismo de biotransformação inclui vários sistemas enzimáticos, os quais atuam em diversos tipos de substratos. Muitas destas enzimas possuem uma função comum: converter estruturas químicas tóxicas em estruturas químicas menos tóxicas e, dessa forma, converter elementos químicos lipofílicos em estruturas hidrofílicas, que serão mais rapidamente excretadas. Dessa forma, as enzimas envolvidas nessas reações de

biotransformação podem ter sua atividade alterada, o que pode servir como um excelente biomarcador de exposição as mais diferentes substâncias (CAJARAVILLE *et al.*, 2003).

O metabolismo envolve dois tipos de reações bioquímicas principais, conhecidas como reações de fase I e reações de fase II. Com frequência, mas não invariavelmente essas reações ocorrem sequencialmente.

As reações de fase I são catabólicas (oxidação, redução, hidrólise), e com frequência os produtos são quimicamente mais reativos e, portanto, paradoxalmente, algumas vezes mais tóxicos ou carcinogênicos que a substância original. Nestas reações, grupos funcionais, como por exemplo, -OH, -NH₂, -COOH, entre outros, são introduzidos nas reações mencionadas acima e pode ocorrer então, a produção de metabólitos radicalares ou eletrofílicos, e aumento na geração EROs/ERNs (SOLÉ *et al.*, 1995).

As reações de fase II são anabólicas, e envolvem conjugação, que habitualmente resultam em produtos inativos, embora haja exceções (HANG *et al.*, 2004). Conjugações são reações de adição de grupamentos químicos ou compostos como açúcares e aminoácidos que são covalentemente ligados as drogas e aos compostos xenobióticos. Com frequência, as reações de fase I introduzem um grupo relativamente reativo, como a hidroxila. A seguir este grupamento, atua como ponto de ataque para o sistema de conjugação (HANG *et al.*, 2004). As enzimas mais estudadas da Fase II são as glutathione transferases, UDP glucuronosil transferases e as sulfotransferases (HUGGETT *et al.*, 1992). Enzimas de Fase II podem ser utilizadas como biomarcadores tanto de exposição como de efeito, por serem alteradas por vários xenobiontes.

2.2.3.1 EROD (Etoxiresorufina – O- deetilase)

O citocromo P450 (CYP 450) compreende uma grande família de heme proteínas ligadas a membranas, as quais se encontram predominantemente no retículo endoplasmático liso e nas mitocôndrias de células hepáticas, renais, cerebrais e de outros órgãos (STEGEMAN *et al.*, 1992; BUCHELI e FENT, 1995). A nomenclatura utilizada para estas enzimas está relacionada ao seu pigmento co-ligante que possui uma redução do pico de absorção em 450nm (OMURA e SATO, 1994).

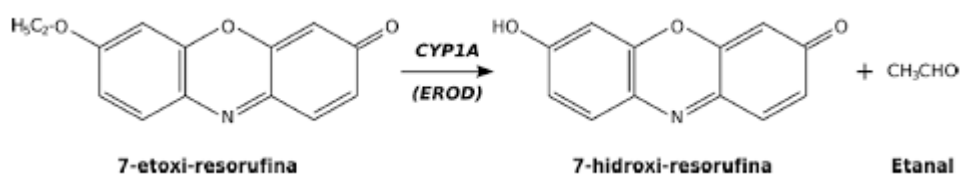
As reações do citocromo P450 podem ser organizadas de acordo com o tipo de substrato e podem ser divididas entre a biossíntese e degradação de compostos endógenos e a metabolização de xenobióticos (STEGEMAN *et al.*, 1992). Estas reações, pertencentes à fase

I de biotransformação, participam da primeira etapa para a excreção e detoxificação de compostos, porém também podem liberar espécies químicas intermediárias reativas e tóxicas.

A bioquímica e biologia celular das monooxigenases dependentes de citocromo P450, incluindo perspectivas sobre suas formas, funções e regulação em organismos aquáticos têm sido extensivamente estudadas (BUCHELI e FENT, 1995). Em peixes, a alteração do citocromo P450 em células do fígado é reconhecida como um excelente biomarcador de exposição a contaminantes orgânicos antropogênicos, como por exemplo, os HPAs, as bifenilas policloradas, dioxinas e furanos (GOKSOYR *et al.*, 1991). A indução desse sistema é considerada um indicador biológico geral, mas sua resposta não permite discriminação de classes específicas de poluentes (GORBI e REGOLI, 2004). Através da alteração da estrutura química de compostos orgânicos, o citocromo P450 pode gerar compostos não tóxicos, menos ou mais tóxicos do que a substância original (SCHLENK, 2008). Entretanto, o metabolismo pode ser levado à ativação, quando espécies intermediárias altamente reativas são produzidas e são mais tóxicas que o composto parental (PARKINSON, 1995).

Todas as etapas da cascata de indução ao CYP 1A (RNAm, proteínas e atividade catalítica) podem ser utilizadas para avaliar a expressão do CYP 1A em peixes. (BUCHELI e FENT, 1995; SARASQUETE e SEGNER, 2000). Assim, pode-se determinar a atividade de CYP450 em nível de RNAm ou nível protéico (*Western blotting*, localização imunohistoquímica) ou através da atividade catalítica da enzima relacionada, a 7-etoxiresorufina. O método mais frequentemente utilizado para avaliar a indução do CYP1A em resposta à indução por xenobióticos é a atividade da EROD. O ensaio de etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD) mede a catálise de CYP 1^a por *O*-desalquilação, de um substrato não fluorescente, a 7-etoxiresorufina, em um produto fluorescente, a resorufina, que pode ser medida por espectrofluorometria (FIGURA 2). Esta reação consome NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e O₂.

FIGURA 2 - REAÇÃO MOSTRANDO ATIVIDADE DO CITOCROMO P₄₅₀ SOBRE A 7-ETÓXI-RESORUFINA.



A atividade da EROD é geralmente determinada utilizando microsomo, que são as membranas do retículo endoplasmático, aonde se encontra o citocromo P450. Usualmente estes microsomos são preparados a partir de homogenatos de tecidos, por ultracentrifugação. Este método também pode ser utilizado para células isoladas, porém seria necessário um grande número de células, o que levou ao surgimento de métodos alternativos que permitem a mensuração da atividade da EROD, sem a necessidade do preparo de microsomos (BEHRENS *et al.*, 1998).

O aumento da atividade da EROD em vertebrados é um indicador da indução do CYP1A auxiliando, portanto, no monitoramento ambiental. Uma das vantagens da utilização da atividade da EROD como biomarcador é a relativa simplicidade da sua mensuração (BUCHELI e FENT, 1995). Metais, como prata, cádmio e cobre, conhecidamente desreguladores de regulação iônica, causam danos histológicos e são classicamente compostos que alteram a atividade da EROD. Dioxinas, bifenilas policloradas (PCBs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) induzem o citocromo P450 1A (CYP 1A) e peixes expostos a organoestânicos, benzeno, cádmio e acrilamida apresentaram forte e significativa redução da atividade de EROD (BUCHELI e FENT, 1995; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Assim, em ambientes altamente contaminados, pode haver uma deficiência no controle dos passos do ciclo catalítico do citocromo P450 favorecendo uma produção aumentada de EROs/ERNs, em função de uma atividade exacerbada deste sistema na detoxificação dos xenobióticos. O suprimento de elétrons para o sistema pode, por exemplo, não acompanhar o nível de atividade do sistema, o que favoreceria a produção de O_2^- e H_2O_2 , podendo como consequência levar o organismo a uma situação de estresse oxidativo.

Sob tal situação, modificações metabólicas em diferentes níveis podem ocorrer nos organismos. Dentre estas modificações, destacam-se análises de lesões em biomoléculas e alterações na atividade de sistemas antioxidantes (LIVINGSTONE, 2001).

2.2.3.2 Glutathione S-transferases (GSTs)

A glutathione S-transferase forma uma família de enzimas de biotransformação da fase II multifuncional, está presente no citosol de muitas células catalisando a conjugação do tripeptídeo glutathione em uma unidade de compostos com o núcleo eletrofílico envolvidos na eliminação de radicais de oxigênio e intermediários reativos (RIOL *et al.*, 2000).

A enzima glutathione S-transferase (GST), pertence à fase II do metabolismo sendo responsável pela conjugação de componentes eletrofílicos ou oriundos da fase I, com a glutathione reduzida (GSH) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A família das enzimas GSTs é caracterizada por ter uma ampla especificidade de substrato com baixa afinidade. Esta baixa eficiência catalítica teve importante papel na evolução das GSTs como agente desintoxicador de amplo espectro, tanto de componentes endógenos (metabólitos celulares), quanto exógenos (metais, agrotóxicos, fármacos) (TEW e RONAI, 1999). A atividade desta enzima pode ser indiretamente associada ao estresse oxidativo, uma vez que ela utiliza como cofator a GSH (glutathione reduzida), e este também participa da degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da atuação da enzima GPx (glutathione peroxidase). Consequentemente, para uma avaliação mais concreta, a associação de outros biomarcadores de estresse oxidativo se faz necessária.

2.2.3.3 Metalotioneínas (MTs)

O estresse ambiental, bem como condições fisiológicas variadas, pode induzir a síntese de certas proteínas nos peixes. Acredita-se que algumas destas tenham papel na proteção celular contra o dano causado por perturbações ambientais, entre estas estão as metalotioneínas (MTs), consideradas um importante biomarcador bioquímico não enzimático (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003)

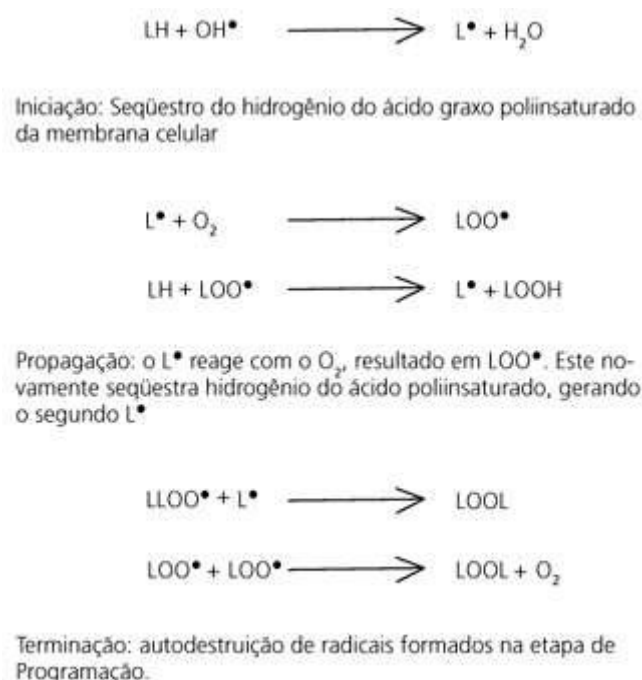
As metalotioneínas constituem uma família de proteínas de baixo peso molecular, ricas em cisteína, que atuam no controle de metais essenciais como Cu e Zn, e na desintoxicação destes e outros não essenciais como o Cd e o Hg (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) protegendo a célula de danos irreversíveis causados por interação com estes metais. O papel das MTs como sequestradoras de metais, bem como a sua indução por exposição a uma ampla variedade de metais (ex. Cd, Cu, Zn, Hg, Co, Ni, Bi e Ag) é bem conhecido e está relacionado com sua função protetora (STEGEMAN *et al.*, 1992; VIARENGO *et al.*, 2000), o que as torna importantes biomarcadores da exposição a metais.

2.2.4. Danos em macromoléculas

2.2.4.1 Peroxidação lipídica (LPO)

Ácidos graxos poli-insaturados são particularmente susceptíveis aos ataques por EROs/ERNs. A abstração de um átomo de hidrogênio destes ácidos graxos por um radical pode levar a formação de um radical lipídico que, por sua vez, pode reagir com o O_2 , formando um radical peroxil. Este por sua vez pode abstrair um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo adjacente estabelecendo assim uma cadeia de reações autocatalíticas que leva à oxidação das membranas em hidroperóxidos lipídicos (FIGURA 3) (ESTERBAUER, 1984). A lipoperoxidação, que é a oxidação dos ácidos graxos insaturados de membrana mediada por radicais livres, é um potencial biomarcador de contaminação ambiental (STEGEMAN *et al.*, 1992; HAI *et al.*, 1995), através dela podemos inferir sobre os danos causados as células pelo estresse oxidativo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

O processo de peroxidação lipídica ocorre por uma reação em cadeia, e demonstra a habilidade de uma única espécie radicalar em propagar reações bioquímicas deletérias (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Quando um radical livre qualquer interage com um ácido graxo insaturado da membrana celular, ocorre o sequestro um átomo de hidrogênio resultando na formação de um radical lipídico, este reage com O_2 , abundante nas regiões de membrana, gerando um radical peroxila, que por sua vez irá sequestrar um átomo de hidrogênio de um novo ácido graxo formando hidroperóxido e um novo radical lipídico que dará continuidade a reação em cadeia.

FIGURA 3: ETAPAS DA REAÇÃO DE LIPOPEROXIDAÇÃO.

Fonte: Batista, Costa e Pinheiro-Sant' Ana (2007).

A peroxidação lipídica tem sido indicada como uma das maiores contribuidoras para a perda da função celular em situações de estresse oxidativo. A peroxidação lipídica pode, por exemplo, provocar o rompimento das membranas celulares levando a uma liberação de cálcio para as células e, por consequência, levar a uma ativação descontrolada de lipases e proteases, enquanto que o ataque a membranas mitocondriais pode alterar sua permeabilidade e induzir a um desequilíbrio do mecanismo energético das células (STOREY, 1996).

2.2.5 Biomarcadores genéticos

Em se tratando de entender as diferenças desses mecanismos, mudanças encontradas no aparato genético de organismos expostos aos contaminantes no ambiente são essenciais na demonstração do impacto que estes contaminantes podem ter nos parâmetros ecológicos, como os efeitos populacionais, por exemplo. Deste modo, o campo das ciências ambientais que tem por objetivos (i) identificar mudanças no material genético da biota, que pode ter sido induzido por exposição a contaminantes genotóxicos no meio ambiente e (ii) as consequências em vários níveis da organização biológica (molecular, celular, individual,

populacional, etc.) que podem ser resultado desta exposição, é chamado de genética (eco) toxicológica (ADAMS E ROWLAND, 2002).

Neste caso, é importante ressaltar a presença de dois tipos possíveis de efeitos dentro da genética toxicológica. Primeiro, existem efeitos que podem ocorrer em células somáticas e outros que podem ocorrer em células reprodutivas e, estes efeitos podem levar a doenças que não são herdáveis, porém seriam responsáveis por reduzir a variabilidade desta espécie, e doenças herdáveis pela prole destes indivíduos. A segunda classe de efeitos estaria relacionada a resultados indiretos da exposição aos contaminantes, levando a alterações na genética populacional, como por exemplo, a redução da variabilidade genética e a variação nos mecanismos de adaptação dentro de uma mesma espécie (ADAMS E ROWLAND, 2002).

Desta forma, o termo mutagenicidade refere-se à indução permanente de mudanças transmissíveis na estrutura do material genético de células ou organismos. Estas mudanças (mutações) podem ocorrer apenas em um gene ou em vários deles. Genotoxicidade trata-se de um termo mais amplo que se refere à habilidade de interação com o DNA e/ou com o aparato celular que regula a fidelidade do genoma, como o aparato de divisão celular e as enzimas topoisomerases.

Um vasto número de biomarcadores genéticos são utilizados como ferramentas para a detecção de exposição e para avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos. Esses biomarcadores incluem testes como avaliação de aberrações cromossômicas, adutos de DNA, quebras simples e duplas no DNA e análise da frequência de micronúcleo e outras alterações nucleares (BOMBAIL *et al.*, 2001). Devido a essa diversidade de respostas possíveis para estes marcadores, fica explícita então, a necessidade de se utilizar mais de um ensaio para a avaliação de xenobióticos. Além disso, as análises desses elementos e seus efeitos sobre o material genético são importantes na avaliação de seu papel mutagênico e/ou carcinogênico, pois apesar de a toxicidade genética não ser uma medida de carcinogenicidade, esta é frequentemente utilizada para indicar o câncer, uma vez que estes testes medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (ADAMS e ROWLAND, 2002).

2.2.5.1 Teste do micronúcleo píceo e alterações morfológicas nucleares

Originalmente, o teste de micronúcleo foi desenvolvido para estudos *in vivo* dos efeitos de produtos químicos. Para tanto, eram utilizadas células sanguíneas obtidas da medula óssea do fêmur de camundongos. Apenas mais tarde passou-se a usar eritrócitos

circulantes de peixes. Nos dois casos citados acima, os testes eram realizados em condições experimentais e laboratoriais altamente controladas (SCHMID, 1975).

HEDDLE (1973) e SCHMID (1975), independentemente, propuseram um tipo de ensaio que permitiria a avaliação do dano ao DNA pela análise e quantificação de uma estrutura citoplasmática conhecida pelos hematologistas como corpúsculo de Howell-Jolly, os quais são encontrados em populações celulares em divisão. Foram essas estruturas que receberam o nome de micronúcleos. Micronúcleos são cromossomos inteiros ou parciais que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular e que aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntico em aparência ao núcleo celular. Do mesmo modo, podem ocorrer anomalias celulares, formadas quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, mas apresente uma saliência de cromatina (BOMBAIL *et al.*, 2001). Consequentemente, o ensaio detecta tanto os eventos clastogênicos, ou seja, eventos de dano diretamente no cromossomo e seus componentes, notadamente no DNA, como os defeitos no fuso celular e outros componentes envolvidos na formação do fuso, conhecidos como mecanismos aneugênicos (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

O teste do micronúcleo foi originalmente desenvolvido por SCHMID (1975) para células da medula óssea de camundongos e foi adaptado por HOOFTMAN e de RAAT (1982) para o estudo de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratórios. Esta modificação da técnica original passou a ser conhecida como Piscine Micronucleus Test, e é adotado como Teste do Micronúcleo Písceo.

O princípio do teste baseia-se no fato de que, durante o processo de divisão celular, principalmente na anáfase, as cromátides e os fragmentos cromossômicos acêntricos não são transportados pelas fibras do fuso para os polos opostos, enquanto que os fragmentos com centrômero o são. Após a telófase, os cromossomos sem dano são incluídos no núcleo de cada uma das células filhas. No entanto, alguns elementos, normalmente muito pequenos, não são incluídos nos núcleos formados e permanecem no citoplasma, constituindo as estruturas caracterizadas como micronúcleos (SCHMID, 1975). Evidencia-se que o teste só pode ser realizado com populações de células que tenham a capacidade de entrarem em divisão e preferencialmente que a análise seja feita após um único ciclo de divisão celular, pois existe a incerteza da permanência destas estruturas por mais de um ciclo de divisão (FENECH, 2000).

Os efeitos de substâncias que provoquem quebras cromossômicas ou ainda afetem os componentes do fuso ou da região centromérica podem ser detectados a partir da presença de micronúcleos. Deve-se ressaltar que nem todos os produtos genotóxicos são clastogênicos,

pois muitos induzem à formação dos micronúcleos por sua capacidade de afetarem o fuso (HEDDLE *et al.*, 1991).

São considerados micronúcleos aqueles que são formados e estão visivelmente separados do núcleo principal da célula possuindo um tamanho que corresponde a 1/5 a 1/20 do tamanho deste núcleo e ainda que não ultrapassem em 1/3 o tamanho do núcleo principal. Devem ainda, possuir bordas distinguíveis e com a mesma refração do núcleo principal. No caso específico dos peixes, devido ao tamanho normalmente reduzido dos cromossomos, esta proporção de tamanho passa para a faixa de 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo original (AL SABTI e METCALFE, 1995; AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2000; GUSTAVINO *et al.*, 2001).

Durante o processo de contagem dos micronúcleos, são analisadas entre 1 mil e 2 mil células, com membranas citoplasmáticas e nucleares intactas, não sendo analisadas aquelas que estejam sobrepostas ou danificadas (AL SABTI e METCALFE, 1995). Sendo assim, devemos levar em consideração a ocorrência espontânea de micronúcleos, que no caso dos peixes ocorre em uma taxa basal muito baixa, ocorrendo em uma maior frequência em roedores (cerca de 3%) (WILLIAMS e METCALFE, 1992).

Alguns fatores devem ser levados em consideração ao aplicarmos o ensaio com micronúcleos. O ensaio não é capaz de detectar as não disjunções mitóticas, se estas não levarem à perda cromossômica na anáfase, bem como também não será possível detectar aberrações cromossômicas causadas por rearranjos, tais como translocações ou inversões, se estas não forem capazes de originar fragmentos acêntricos. Consequentemente, neste aspecto, o teste apresenta uma subestimativa e falta de sensibilidade (METCALFE, 1989).

A avaliação das alterações nucleares e os micronúcleos têm sido utilizados para estimar o nível de exposição aos contaminantes em muitas pesquisas, principalmente na investigação de efeitos genotóxicos de poluentes ambientais (AL-SABTI, 1986), desde os anos 80. Esse teste mede o dano cromossômico estrutural ou numérico e tem sido usado para avaliar genotoxicidade, sendo um indicador recomendado para estudos ambientais tanto em condições laboratoriais como no campo (BELPAEME, COOREMAN, KIRSCH-VOLDERS, 1998).

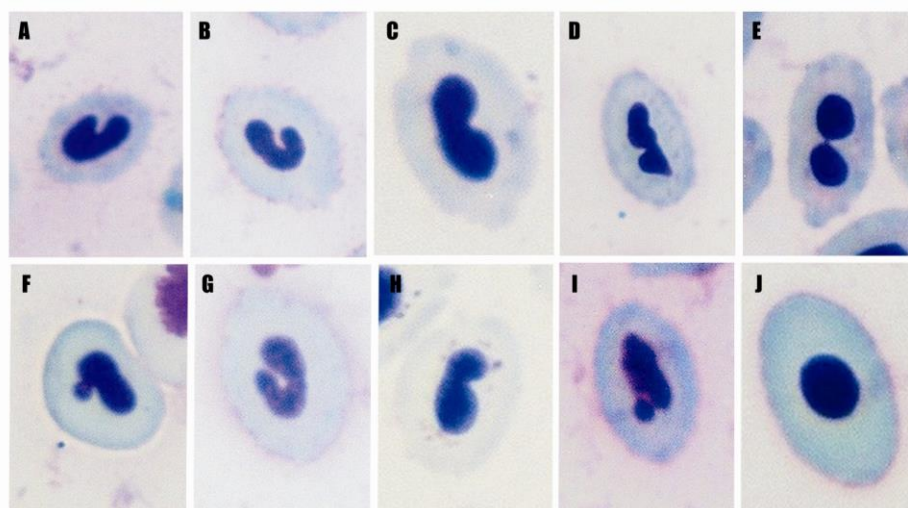
Existem vários ensaios de mutagenicidade e o teste do micronúcleo tem sido aplicado com sucesso por se tratar de um ensaio simples, seguro e sensível, e por não depender da característica cariotípica do animal em estudo (MINISSI, CICCOTTI, RIZZONI, 1996). Por estas razões, o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes tem se mostrado uma técnica promissora em investigações de mutagênese com causas ambientais (AL-SABTI e

METCALFE, 1995). Ensaaios de micronúcleos em peixes são geralmente realizados com eritrócitos do sangue periférico devido à facilidade do seu uso. Além de eritrócitos, outros tipos de células, como de brânquias e de fígado, também foram usados por diversos autores como uma alternativa (MANNA e SADHUKHAN, 1986).

Em peixes, os diversos tipos de alterações nucleares ainda não apresentam sua origem completamente compreendida. CARRASCO, TYLBURY e MYERS (1990) descreveram e fotografaram as alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de peixes (FIGURA 4). Essas lesões foram basicamente descritas em:

- a) *Blebbbed*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro). O tamanho destas evaginações varia desde pequenas protuberâncias a estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal.
- b) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os blebbbed. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.
- c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.
- d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Esses cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear.

FIGURA 4 - EXEMPLOS DE ERITRÓCITOS COM ALTERAÇÕES NUCLEARES ENCONTRADOS NOS EXEMPLARES (a, b, c, d, e, f, g, h, i), BEM COMO A PRESENÇA DE ERITRÓCITOS COM NÚCLEOS NORMAIS (j).



Existem dois métodos de coloração diferentes mais utilizados, aplicáveis para o teste do micronúcleo: um dos métodos utiliza azul de metileno/Giemsa e o outro utiliza laranja de acridina. A coloração que utiliza azul de metileno/Giemsa tem vantagens como a distinção da coloração dos eritrócitos imaturos e dos eritrócitos maduros em ratos, bem como a preservação das lâminas. No entanto, a especificidade da coloração com azul de metileno/Giemsa para com os eritrócitos imaturos não é adequada para a observação de micronúcleos (SUGIHARA *et al.*, 2000).

A outra técnica de coloração, que utiliza laranja de acridina (FIGURAS 5 e 6), é mais comumente utilizada em mamíferos, foi primeiramente modificada para peixes por UEDA *et al.* (1992) e utilizada com sucesso por HAYASHI *et al.* (1998) em células de brânquias de peixes e do sistema eritrocitário. Este método possui uma grande vantagem por se tratar de um corante altamente específico, que permite uma determinação mais exata da frequência de eritrócitos imaturos micronucleados, mas com a desvantagem de que as amostras só podem ser observadas por um curto período de tempo. Entretanto, este método é fortemente recomendado especialmente para espécimes em que o sangue periférico é utilizado, pois os micronúcleos e os eritrócitos imaturos podem ser mais facilmente identificados devido a sua grande especificidade de coloração. Este método, porém, exige a preparação das lâminas sem fixação para a obtenção de células coradas, bem como a contagem de micronúcleos em eritrócitos imaturos no máximo um dia após a coloração devido à instabilidade da laranja de acridina.

FIGURA 5 - EXEMPLOS DE ERITRÓCITOS NORMOCROMÁTICOS (MADUROS) COM ALTERAÇÕES NUCLEARES ENCONTRADOS NOS EXEMPLARES (a, b, c, d, e, f, g, h, i), BEM COMO A PRESENÇA DE ERITRÓCITOS COM NÚCLEOS NORMAIS (j).

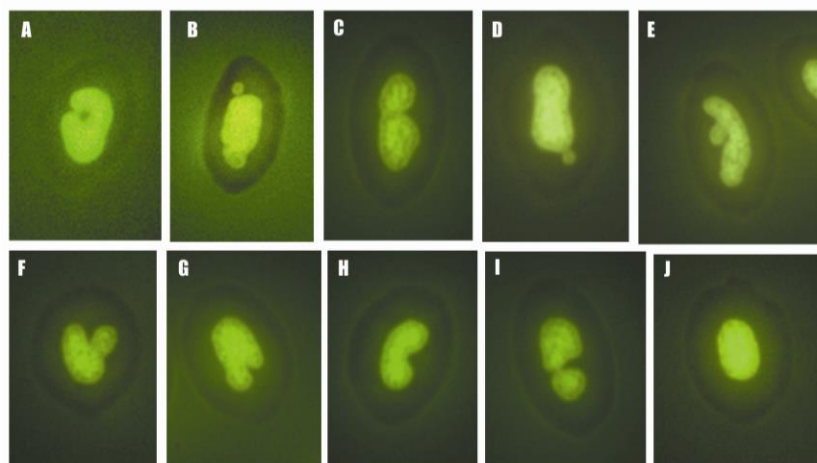
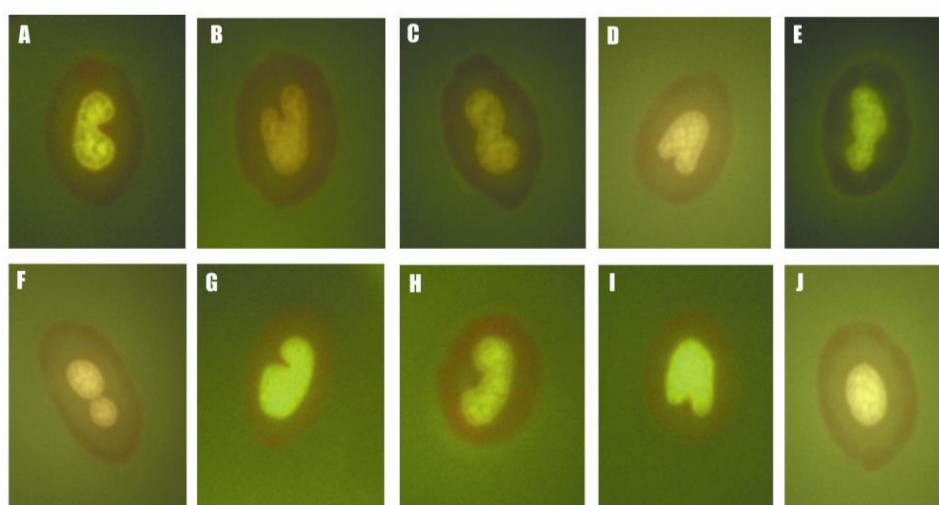


FIGURA 6 - EXEMPLOS DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS (IMATUROS), COM ALTERAÇÕES NUCLEARES ENCONTRADOS NOS EXEMPLARES BEM COMO A PRESENÇA DE ERITRÓCITOS COM NÚCLEOS NORMAIS (a, b, c, d, e, f, g, h, i), (j).



Çavas e Ergene-Gözükara (2005a) também utilizaram a coloração de laranja de acridina, no lugar da coloração que utiliza Giemsa, com o intuito de detectar a presença de micronúcleos em eritrócitos recém-formados, melhorando assim a sensibilidade do teste. Neste caso, o princípio do teste baseia-se na presença de um conteúdo de RNA nas células, que teriam citoplasmas avermelhados e fluorescentes. O critério para a identificação de micronúcleos em eritrócitos jovens segue três princípios básicos: (a) o micronúcleo deve ser menor do que 1/3 do tamanho do núcleo total; (b) o micronúcleo deve estar completamente

separado do núcleo principal; (c) o micronúcleo deve estar no mesmo plano de foco e ter a mesma cor do núcleo principal.

2.2.5.2 Ensaio cometa

O Ensaio Cometa, também conhecido por SCGE (*Single-Cell Gel Eletrophoresis*), é uma técnica capaz de detectar dano ao DNA em células individualizadas (FERRARO *et al.*, 2004), através da medição da migração em gel do DNA dos nucleóides depois de uma corrida eletroforética (SINGH *et al.*, 1988). O nome cometa refere-se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica (BOMBAIL; GORDON; BATTY, 2001).

O princípio da técnica se baseia no fato de que o DNA da célula que não possuir dano migrará em conjunto, formando um círculo. Caso ocorra dano ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos. Os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os maiores. Ocorrendo um dano muito intenso, em uma célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se então a figura típica de um cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990). As quebras detectadas pelo ensaio podem ocorrer em virtude da digestão do DNA ao processo de apoptose. Para Olive, Banáth e Durand (1990), as células que se encontram neste processo são distinguíveis das outras, pois não apresentam um nucleóide típico, estando todo o seu DNA fragmentado.

O consenso geral atual é que este ensaio é simples, rápido e sensível, capaz de detectar uma quebra em 1×10^{10} Da. O ensaio também apresenta a vantagem de utilizar qualquer célula nucleada eucariótica, inclusive células vegetais (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998). Contudo, uma das maiores críticas a esta técnica é que a ocorrência de quebras no DNA não pode ser atribuída a uma exposição específica (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

São muitas as metodologias empregadas para a avaliação da extensão do dano causado ao DNA. Uma das medidas utilizadas na avaliação do dano é realizada através da relação entre o raio do núcleo e a extensão das “caudas” formadas pelo DNA em migração (classificados como classe 0 - nenhum dano, até a classe 4 - possivelmente em apoptose). Esta análise pode ser feita visualmente ou através de softwares especiais.

Nos últimos anos, tem crescido o interesse científico no Ensaio Cometa ou eletroforese em gel para demonstrar danos no DNA induzidos por contaminantes (BELPAEME *et al.*, 1998). Para tanto, são necessários métodos sensíveis adequados para se

avaliar o impacto crônico desses contaminantes nos organismos. Diversas publicações provam que o ensaio cometa é realmente capaz de detectar danos no DNA causados por diferentes classes de agentes mutagênicos em peixes. A resposta pode, é claro, depender das condições experimentais, das espécies, do tipo de célula, do mutágeno e da duração da exposição (BELPAEME *et al.*, 1998).

Uma vez que, substâncias genotóxicas, muito frequentemente são tecido - específicas, ficam evidentes as vantagens do uso do Ensaio Cometa. Este ensaio não depende da proliferação celular para ser realizado, podendo ser utilizado em, virtualmente, qualquer tipo de célula (PADRANGI *et al.*, 1995; ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999; FERRARO *et al.*, 2004). Então, o tecido alvo do agente genotóxico pode ser analisado diretamente, sendo que as células danificadas podem ser quantificadas individualmente (PADRANGI *et al.*, 1995).

Ostling e Johanson (1984) desenvolveram a técnica da eletroforese em lâmina com gel chamaram-na então de Ensaio Cometa, devido à forma peculiar tomada pelo DNA, que sofreu o processo de migração ao final da corrida eletroforética. Nesta técnica, as células eram misturadas em agarose de baixo ponto de fusão e depositadas sobre uma lâmina com agarose normal. Posteriormente, passariam por um processo de lise celular, por detergentes e soluções salinas altamente concentradas. A lise permite a liberação do DNA. As lâminas eram então submetidas à eletroforese em tampão neutro. Esta técnica apresentava algumas limitações, pois só era capaz de detectar quebras de fita dupla no DNA e ainda poderia ser confundido com o RNA ainda presente no núcleo (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

Singh *et al.* (1988), com a intenção de verificar danos no DNA ocasionados por Raios – X e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), desenvolveram uma variação da técnica anteriormente descrita, utilizando-se de um tampão de eletroforese com pH superior a 13. Com esta modificação, foi possível a detecção no DNA das quebras em fita simples, sítios álcali-lábeis e sítios de reparo tardio.

Então, resumidamente, o ensaio consiste das etapas de preparação da suspensão celular, incubação em uma solução de lise, etapa de desespiralização do DNA e uma corrida eletroforética. O papel da lise no ensaio cometa é o de remover os conteúdos celulares, com exceção do material nuclear. O DNA permanece bem condensado devido à presença de uma pequena quantidade de proteínas não histônicas. Porém, quando colocado na solução de eletroforese, com pH maior que 13, a espiralização do DNA começa a relaxar a partir dos pontos de quebra da fita, permitindo, dessa maneira, que os mesmos sejam revelados pela eletroforese na sequência do teste (YENDLE *et al.*, 1997).

As condições de pH da solução de lise e do pH do tampão de eletroforese que proporcionam o relaxamento da molécula de DNA influenciam no tipo de dano a ser visualizado, bem como nas características do cometa obtido. Sob condições neutras (pH 7,5) os cometas apresentam caudas mais densas enquanto que sob condições alcalinas (pH>10) estas são mais dispersas (KLAUDE *et al.*, 1996).

Como o ensaio cometa analisa as células individualmente, estas têm que ser individualizadas, da forma que existe certa limitação no sentido de separar as células. As células devem então ser separadas por processos de fragmentação ou através da aplicação de enzimas. Estas células devem ser convenientemente separadas por meios que não as danifiquem, mas que permitam sua individualização. No caso de células sanguíneas estas podem ser diluídas em soro bovino fetal ou em solução fisiológica. Qualquer que seja o meio a ser utilizado, todo o processamento das células deve obrigatoriamente ser executado sem que danos adicionais ao DNA possam ocorrer. Desta forma, as células devem ser manipuladas ao abrigo da luz, uma vez que esta causa danos ao DNA (FERRARO *et al.*, 2004).

MIYAMAE *et al.* (1998) constataram a viabilidade dos núcleos de células isoladas a partir das técnicas da homogeneização de rim, fígado, pulmão, baço e medula óssea em ratos. Esses autores, ao trabalharem com os agentes MMS (metilmetanossulfonato) e o DEN (dietilnitrosamina), verificaram que estes agem de maneira diferente em cada um dos tecidos; enquanto o MMS agiu em todos os órgãos, o DEN induziu dano genético somente no fígado, rim e pulmão. Essas diferenças podem refletir diferentes mecanismos de danos ao DNA. Enquanto o MMS reage diretamente com DNA, o DEN reage secundariamente via seus metabólitos intermediários. Outro fato importante observado nesse trabalho foi que os danos genéticos diminuíram 24 horas após o tratamento com MMS em todos os órgãos, provavelmente em decorrência do reparo e/ou morte das células danificadas, o que não foi observado no tratamento com DEN. Essas diferenças podem, dessa forma, influenciar sobre o potencial carcinogênico de cada um destes químicos.

Trabalhos realizados com camundongos contaminados com agente conhecidamente genotóxico (etilnitrosurea) verificaram que a técnica de homogeneização foi a mais eficiente para a dissociação celular. Estes autores trabalharam com a homogeneização de vários órgãos (fígado, pulmão, baço, rim e medula óssea) em uma solução de homogeneização com 0,075 M NaCl e 0,024 M Na₂EDTA e pH 7,5. As porções dos órgãos foram homogeneizadas em homogeneizador Potter ®. Após a homogeneização, o homogenato obtido foi então centrifugado e os núcleos obtidos foram então levados para a realização do ensaio cometa (SASAKI *et al.*, 1997).

As quebras de fita simples, detectadas pelo método alcalino, resultam de vários tipos de reações como, por exemplo: reparo por excisão de nucleotídeos ou de bases; excisão direta de proteínas estruturais do DNA por agentes químicos ou físicos; excisão seguida de intercalação de agentes químicos na estrutura do DNA; ação de endonucleases ou topoisomerases entre outros (HORVÁTHOVÁ *et al.*, 1998; MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998). Sob o aspecto do reparo da molécula de DNA, os organismos aquáticos, e no caso específico dos peixes, os mecanismos de reparo do DNA são mais lentos do que nas células de mamíferos (ESPINA e WEISS, 1995).

É importante ressaltar que a técnica do ensaio cometa foi originalmente desenvolvida para detectar efeitos genotóxicos em mamíferos, mostrou-se, porém de grande eficiência na detecção de substâncias genotóxicas em organismos de ambiente aquático, além de encontrar amplo emprego na área clínica em estudos de reparo do DNA no biomonitoramento ambiental e no monitoramento humano (FERRARO *et al.*, 2004).

O ensaio cometa é habitualmente realizado com eritrócitos, pois estes são facilmente obtidos por métodos não destrutivos e não necessitam do passo adicional de isolamento, porém outros tecidos também têm sido testados, pois os efeitos de genotoxicidade de contaminantes podem ser muitas vezes, tecido-específicos (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998). O sangue também apresenta a vantagem de apresentar em sua composição aproximadamente 97% de eritrócitos nucleados e apenas cerca de 3% de leucócitos, o que confere alta homogeneidade ao tecido (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998).

Os tecidos mais pesquisados, além do sanguíneo, são do fígado, por se tratar do principal órgão do metabolismo, das brânquias, devido ao seu contínuo contato com a fase aquosa e do rim, tecido produtor de sangue em peixes (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

Segundo BELPAEME; COOREMAN e KIRSCH-VOLDERS (1998), apesar das inúmeras vantagens do ensaio, algumas desvantagens importantes permanecem, como a inabilidade de detectar dano genético assim como mutação gênica; lesões produzidas no DNA não são estáveis e podem ser reparadas, assim como a estimativa em longo prazo dos efeitos em organismos é difícil; elevadas variabilidades inter e intra-individuais podem impedir a clara interpretação dos resultados e a quantificação do número de quebras não é possível.

2.2.5.3 Ensaio de difusão do DNA

O ensaio de difusão do DNA é uma versão modificada do ensaio do cometa, porém sem a fase de eletroforese. O ensaio de difusão do DNA foi primeiramente desenvolvido por Sestili *et al.* (1999, 2006), chamado Alkali-Halo Assay (AHA). Esta técnica permite a detecção de quebras de cadeia simples do DNA em células isoladas, e apresenta sensibilidade semelhante ao ensaio cometa. Há algumas semelhanças entre a técnica do ensaio de difusão e do ensaio cometa, porém o ensaio de difusão não apresenta a etapa de eletroforese para separar os fragmentos de DNA danificados dos não danificados, somente é realizada incubação das lâminas pós-lise em tampão alcalino.

Este ensaio foi desenvolvido primeiramente para linfócitos humanos, buscando a quantificação de apoptoses (SINGH, 2000). O mecanismo de apoptose ou morte celular programada nos tecidos de um organismo não está associado com inflamação ou cicatrizes, ao contrário da necrose. Apoptose é um evento natural que ocorre durante e após o desenvolvimento. É um evento importante e inevitável na remodelação de tecidos durante o desenvolvimento e envelhecimento (SEARLE *et al.*, 1982). Este fenômeno pode também ocorrer em células danificadas por alguns contaminantes. Também é um processo crucial para eliminar as células cancerosas (GUCHELAAR *et al.*, 1997).

O ensaio de difusão do DNA é um método simples, sensível e rápido para estimar a apoptose em células individuais. As lâminas contendo as células em agarose são submetidas a uma solução de lise de sais e detergentes (para permitir a difusão de DNA de baixo peso molecular em agarose) e, finalmente, a visualização do DNA por um corante fluorescente sensível (SINGH, 2000). Os núcleos das células apoptóticas são indefinidos, sem qualquer limite claro devido a difusão do DNA em agarose, além de apresentar um diâmetro de 3 vezes maior que o diâmetro médio do núcleo. Já os núcleos de células necróticas têm um limite externo bem definido e uma aparência relativamente homogênea (SINGH, 2000).

Com o ensaio de difusão é possível identificar os processos de apoptose e necrose, que podem ser causados devido à fatores secundários, ou seja, causados por fatores não necessariamente genotóxicos, como, por exemplo, produção de espécies reativas de oxigênio ou atividade enzimática (PARK *et al.*, 1991; SPEIT *et al.*, 1995). Com base nas diferenças estruturais entre os núcleos apoptóticos e necróticos, recomenda-se que o ensaio de difusão DNA seja usado para distinguir células apoptóticas, oriundas de células necróticas. No entanto, outros pesquisadores foram incapazes de diferenciar entre células apoptóticas e necróticas através deste ensaio (GICHNER *et al.*, 2005). O uso do ensaio de difusão do DNA

para avaliar a apoptose foi revisado por Singh (2005) e sua aplicação em um pequeno número de estudos ambientais tem mostrado resultados promissores (NIGRO *et al.*, 2002; FRENZILLI *et al.*, 2004; BARGA *et al.*, 2006; FRENZILLI *et al.*, 2008; ROCCO *et al.*, 2010).

2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS METAIS

O termo metal pesado tem sido frequentemente utilizado como o nome de um grupo que inclui os metais e os semimetais (metalóides) que estariam relacionados com toxicidade e ecotoxicidade. Além disso, o termo metal pesado é frequentemente relacionado com situações de poluição, causando um grande número de equívocos quanto o seu significado. O termo “metal” em seu uso convencional refere-se ao elemento puro ou a uma liga de elementos metálicos e o termo “pesado”, em seu uso convencional, implica em alta densidade. O conhecimento das densidades dos metais de suas ligas é pouco informativo do ponto de vista biológico, pois, muitas vezes, não são estas as espécies reativas com as quais os seres vivos interagem (DUFFUS, 2002). É importante ressaltar que alguns desses elementos citados como metais pesados, são necessários em quantidades mínimas para o correto funcionamento dos seres vivos, como cofatores em vias metabólicas (SANCHEZ-GALAN *et al.*, 1999). Portanto, o termo tóxico, atribuído aos metais pesados deve ser utilizado com cautela, já que podem existir diferentes situações de contaminação por esses elementos.

Assim, como o cobre, o zinco e o ferro, por exemplo, são considerados elementos essenciais à vida e não são agentes tóxicos, quando ocorrem em concentrações metabólicas, quando estes se encontram nas células em quantidades que excedem as quantidades necessárias para o metabolismo celular, os mesmos metais podem adquirir uma propriedade tóxica (SANCHEZ-GALAN *et al.*, 1999).

Sabe-se que muitos metais pesados apresentam uma grande afinidade pelos grupos SH das proteínas, muitas vezes causando o impedimento da formação de pontes dissulfeto (-S-S-), podendo assim inutilizar certas enzimas. Neste caso, nenhum mecanismo de ação foi completamente elucidado (HARTWIG, 1998). Os metais pesados podem ainda interagir com o grupo ácido carboxílico (-COOH) e amino (-NH₂), nas extremidades das cadeias protéicas (HARTWIG, 1998).

Ainda em relação à toxicidade dos metais pesados, deve-se considerar ainda que a presença e a biodisponibilidade, de dois ou mais deles no ambiente, pode estabelecer dois a dois, casos de antagonismo e sinergismo, estes relacionados a fatores como tempo de

exposição, efeitos deletérios para indivíduos ou populações e taxas de absorção, acúmulo e desintoxicação (WREN *et al.*, 1995; WIENER *et al.*, 1996).

Compreender a biodisponibilidade, a qual depende de parâmetros biológicos e de parâmetros físico-químicos do metal, é o caminho para averiguarmos o potencial toxicológico dele e de seus compostos. No entanto, ao adotarmos estes parâmetros, eles são dependentes da estrutura atômica, a qual por sua vez é dependente de sua posição na tabela periódica dos elementos. Desta forma, qualquer classificação de cunho científico deve ser necessariamente baseada nesta tabela ou em alguma subdivisão desta (DUFFUS, 2002).

Pela sua incoerência científica, o termo metal pesado, deve ser abandonado. Uma classificação dos metais e de seus compostos firmemente baseada nas suas propriedades químicas se faz necessária. Esta classificação permitiria uma interpretação das bases bioquímicas da toxicidade, bem como forneceria uma base de dados racional para se determinar quais compostos metálicos seriam mais susceptíveis de serem mais tóxicos (DUFFUS, 2002).

2.3.1 O chumbo

O chumbo (Pb) é um metal não essencial, de cor branco acinzentado, brilhante, dúctil, macio e muito resistente à corrosão, que ocorre naturalmente no ambiente. Na tabela periódica dos elementos faz parte da família IV A. Seu peso atômico é 207,19 e seu número atômico 82. Sua densidade é de 11,3 g/cm³. Apresenta os seguintes isótopos naturais: Pb²⁰⁴, Pb²⁰⁶, Pb²⁰⁷ e Pb²⁰⁸. Encontra-se como constituinte de mais de 200 minerais, normalmente estando associado ao enxofre formando o mineral conhecido por galena (87% Pb e 13% S). Outros metais como o zinco, prata, cobre ou ferro, podem estar associados ao chumbo. Devido ao seu baixo ponto de fusão (327,4°C) é facilmente extraído dos minerais aos quais se encontra associado (PAIN, 1995).

Existem duas formas de chumbo inorgânico: Pb II e Pb IV, sendo esta última mais rara. As várias formas orgânicas deste metal estão sempre formando complexos com mais de quatro carbonos. A forma orgânica é mais tóxica que a forma inorgânica, uma vez que a membrana plasmática se apresenta permeável ao complexo metálico. No entanto, o efeito tóxico do chumbo inorgânico aumenta com o acréscimo de carbonos ao complexo e uma quantidade muito maior de chumbo inorgânico circula entre os diversos ecossistemas globais, do que a forma orgânica (PAIN, 1995).

O chumbo, mesmo sendo um elemento não essencial, ocorre naturalmente no ambiente. Entretanto, as concentrações mais elevadas encontradas na natureza são resultado de atividades humanas. Muitas das suas propriedades físicas e químicas como maleabilidade, ductilidade, pobre condutibilidade e resistência à corrosão, têm favorecido o uso do chumbo para uma grande variedade de aplicações pelo homem desde tempos antigos (GARCÍA-LESTÓN *et al.*, 2010).

Muitos registros apontam que no antigo Egito, há mais de 6.000 anos, o chumbo era utilizado como lastro em embarcações, como âncoras, em utensílios de cozinha, na fabricação de tubos e na vitrificação da cerâmica. Os romanos foram os primeiros a utilizar o chumbo em larga escala, para a confecção de utensílios de cozinha, na construção de tubulações dos aquedutos, como pigmento e na preparação e conservação do vinho (GARCÍA-LESTÓN *et al.*, 2010).

A contaminação pelo metal chumbo foi muito importante durante os séculos XVI e XIX, devido ao uso maciço e em larga escala em cerâmicas, ductos, na construção de barcos, na fabricação de janelas, na indústria bélica, e para pigmentos e impressão de livros. Com o advento da Revolução Industrial (Séc. XVIII e XIX) a demanda por este metal aumentou exponencialmente. Muitos desses usos diminuíram ou desapareceram durante o século XIX, mas outros usos foram introduzidos, já no princípio do século XX, como a utilização do chumbo tetraetila no aumento da octanagem da gasolina, a utilização do chumbo em recipientes de vidro para cozimento, ou a utilização de tintas com composto de chumbo (HERNBERG, 2000; GARCIA LESTÓN *et al.*, 2010). No Brasil, a retirada do chumbo tetraetila ocorreu no ano de 1989, sendo um dos primeiros países a retirar o chumbo das gasolinas automotivas. Porém, o chumbo ainda é utilizado em gasolina de aviação.

Atualmente, embora a grande maioria destes usos do chumbo já desapareceu, este metal ainda está presente em muitas atividades industriais, como no reparo de automóveis, na confecção e reciclagem de baterias, na remoção de tintas, nas demolições, refino e na fundição de minérios. Também pode ser utilizado no reparo de estruturas ao ar livre, como por exemplo, pontes, em soldas de latas de alimentos, em cerâmicas vitrificadas, além de podermos encontrar pequenas concentrações na água potável e na fumaça dos cigarros (PATRICK, 2006; SPIVEY, 2007). Desta forma, a contaminação por chumbo, apesar dos mecanismos de controle inserido através das agências regulatórias, precisa ser constantemente avaliada, pois o chumbo é um elemento não biodegradável, e a poluição causada por ele é persistente e em larga escala, afetando as populações de modo geral (GARCÍA-LESTÓN *et al.*, 2010).

A entrada do chumbo no ambiente pode ser de duas formas. A primeira, chamada natural, pela ação dos intemperismos sobre os minerais que possuem o chumbo em sua composição; pelo decaimento radioativo ou ainda por atividade ígnea. A segunda, chamada de antropogênica, tem como origem as atividades humanas de mineração, fundição e industrialização (PAIN, 1995).

A entrada de chumbo especificamente em corpos de água ocorre principalmente por descargas industriais diretas e deposição de partículas aéreas, sendo observadas as maiores concentrações do metal em águas continentais, especialmente próximos aos grandes centros urbanos e empresas que utilizam este metal (PAIN, 1995). O chumbo é altamente tóxico e seus efeitos biológicos conhecidos são sempre deletérios. A forma química e sua concentração na água e nos sedimentos são os fatores que influenciam a taxa de absorção desse metal (PATTEE e PAIN, 2002).

É bem documentado que o chumbo pode causar efeitos adversos à saúde humana que incluem neurotoxicidade, nefrotoxicidade e efeitos deletérios nos sistemas hematológicos e cardiovasculares (ATSDR, 2007). Também existem resultados que mostram que o chumbo induz resposta positiva em testes biológicos e bioquímicos, como inibição de enzimas, mutação, aberrações cromossômicas, câncer e defeitos congênitos (JOHNSON, 1998). Apesar disso, dados relacionados às propriedades mutagênicas, clastogênicas e carcinogênicas de compostos de chumbo inorgânico ainda são conflitantes.

A agência internacional para a pesquisa em câncer (IARC) classificou o chumbo como possível carcinógeno humano (no grupo 2B) (IARC, 1987) e classificou os compostos de chumbo inorgânico, como prováveis carcinógenos humanos (no grupo 2A) (IARC, 2006). Em alguns estudos epidemiológicos, a exposição ao chumbo foi associada a um aumento na incidência de alguns cânceres em seres humanos, como o de estômago, pulmão e bexiga (FU e BOFFETTA, 1995).

A absorção de chumbo por organismos aquáticos pode ocorrer através da pele, brânquias, além da via alimentar (TAO *et al.*, 1999). Trabalhos realizados com peixes de água doce indicam que estes animais tendem a acumular muito mais rapidamente e em maior concentração compostos orgânicos do chumbo, do que os compostos inorgânicos deste metal, provavelmente devido à maior toxicidade de compostos orgânicos do chumbo (PAIN, 1995).

O chumbo inorgânico, após ser absorvido pelos organismos, entra na corrente sanguínea e adere à superfície das hemácias. Em poucos minutos, apenas uma parte deste chumbo estará presente nas hemácias. O restante alcança diferentes órgãos como o fígado, rins ou ossos, tendendo a se fixar neles em diferentes concentrações dependendo do grau de

afinidade. Compostos de chumbo orgânico, por exemplo, são altamente lipofílicos, situação a qual lhes confere uma tendência de deposição em órgãos ricos em lipídios, como o fígado e o cérebro (PAIN, 1995). Dentro das células de cada órgão, o chumbo pode ocupar compartimentos celulares diferentes e formar complexos intracelulares diversos (EWERS *et al.*, 1991).

A localização do chumbo dentro do corpo de cada organismo está relacionada à forma de exposição ao metal. Assim, animais expostos de maneira aguda apresentam altas concentrações deste metal em tecidos moles e baixas concentrações nos ossos. Em exposições crônicas, geralmente encontramos altas concentrações nos ossos (PAIN, 1995). Alguns trabalhos indicam que, com o chumbo, parece não ocorrer o fenômeno da biomagnificação, isto é, o progressivo aumento de sua concentração através dos níveis tróficos da cadeia alimentar (PAIN, 1995). A porção do chumbo que não é absorvida pelos animais pode ser eliminada por duas vias: junto com suas fezes, no caso de ingestão de alimentos contaminados com o metal ou pelos rins, através da urina, se considerarmos outras formas de ingestão (PAIN, 1995).

As principais consequências da exposição crônica ao chumbo são problemas neuromusculares envolvendo principalmente os nervos motores periféricos, como por exemplo, a interferência no processo de formação das conexões nervosas e o desenvolvimento anormal do sistema nervoso. Sintomas como irritabilidade, tremores musculares, delírio, convulsões e paralisias são descritas em humanos. No coração e vasos sanguíneos são descritos sintomas adversos entre os quais miocardites, sístole ventricular lenta, anormalidades cardiovasculares, hipertensão e degeneração vascular. Não menos importantes, podemos verificar também danos aos túbulos renais, esterilidade e imunodepressão (PAIN, 1995; JOHNSON, 1998).

GARCÍA-LESTÓN *et al.* (2010) realizou uma revisão acerca dos efeitos genotóxicos causados pelo chumbo e seus compostos. Para tanto, os autores revisaram diversos estudos, que utilizaram as técnicas mais representativas de avaliação de genotoxicidade, compilando dados de estudos *in vitro*, em animais e em seres humanos. Embora os mecanismos de ação do chumbo não estejam completamente elucidados, provavelmente a ação genotóxica do chumbo seja devido a mecanismos de ação indiretos (HARTWIG *et al.*, 1990; HARTWIG, 1994; LANDRIGAN *et al.*, 2000; SILBERG, 2003; GARZA *et al.*, 2005). O chumbo pode substituir o cálcio ou o zinco em enzimas, mimetizando esses elementos essenciais em algumas enzimas, especialmente aquelas com grupos SH em sua estrutura (JENNETTE, 1981), enzimas que envolvem o processamento do DNA ou o mecanismo de reparo do DNA. Um aumento da genotoxicidade pôde ser verificado, quando o chumbo foi combinado com

outros agentes que sabidamente danificam o DNA, como a fumaça do tabaco a radiação UVA e compostos alquilantes. Estudos apontam o chumbo como um agente co-carcinogênico, este efeito seria em parte devido a uma interferência com os processos de reparo do DNA e desta forma ocorreria a potencialização do efeito genotóxico de outros agentes (FRACASSO *et al.*, 2002).

Entretanto, o estresse oxidativo produzido pelo aumento dos níveis de radicais livres induzidos pela exposição ao chumbo também pode contribuir para a genotoxicidade indireta deste metal (GARCÍA-LESTÓN *et al.*, 2010). O chumbo pode danificar a via oxidativa normal das células fazendo com que estas, acumulem os radicais livres, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido (O_2^-), estes radicais podem promover oxidações de vários compostos celulares. Se um desses compostos for o DNA existe o risco de ocorrerem lesões no mesmo (MERIAN, 1991).

Alguns metais são responsáveis pela quebra das pontes dissulfeto ou mesmo impedem a sua formação. Este tipo de ligação está presente em várias cadeias proteicas. Outro fator relevante se refere à capacidade de alguns metais interagirem com grupos carboxílicos ($-COOH$) e aminas ($-NH_2$) das cadeias proteicas (MANAHAM, 2000).

A estabilidade do material genético é importante para a manutenção de suas funções, como por exemplo, a sua replicação, a expressão gênica e a síntese proteica. Embora constantemente o DNA sofra danos causados por agentes exógenos ou mesmo endógenos, existem mecanismos de reparo para garantir a sua integridade. Os mecanismos de reparo estão baseados em proteínas especiais, as quais possuem em sua estrutura o metal zinco ligado aos aminoácidos, formando estruturas conhecidas por *zinc finger*. As proteínas FPG e XPA são exemplos de proteínas *zinc finger* envolvidas nos mecanismos de reparo do DNA. Outras proteínas que também possuem a estrutura citada estão envolvidas nos mecanismos de controle da expressão gênica, controle do ciclo celular e apoptose (HARTWIG *et al.*, 2002).

2.3.2 O alumínio

O alumínio (Al) é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum na crosta terrestre (FERNANDEZ – DAVILA *et al.*, 2012). Apesar disso, na natureza, ele apenas existe em combinações muito estáveis com outros materiais, particularmente como silicatos e óxidos. Na tabela periódica dos elementos faz parte da família III A. Seu peso atômico é 26.98 e seu número atômico 13. Sua densidade é de 2.7 g/cm^3 . O alumínio puro é um metal

claro e dúctil, com a densidade aproximadamente um terço a densidade do ferro. Este metal é um bom condutor de calor e eletricidade e muito fácil de ser utilizado em soldas. Estas propriedades fazem com que o alumínio seja muito utilizado na indústria. Além disso, o alumínio é muito utilizado em ligas metálicas com cobre, zinco, manganês e magnésio (SJÖGREN *et al.*, 2007).

Em 1825, um químico dinamarquês chamado Örsted produziu pequenas quantidades do metal alumínio, utilizando amalgama de potássio para reagir com cloreto de alumínio anidro. Desde então, com a descoberta da bauxita como a rocha ígnea mais importante que contém alumínio, levou ao desenvolvimento de novos processos para a obtenção de óxido de alumínio (alumina) a partir da bauxita, no final do século XIX. No início, a produção de alumínio era muito modesta, porém aumentou durante o século XX, especialmente depois da segunda guerra mundial. A produção anual de alumínio no início do século XXI foi de 20-22 milhões de toneladas. Hoje, o alumínio e suas ligas são muito utilizados em aviões, trens, caminhões, carros, na indústria civil, e no preparo e embalagem de alimentos. O alumínio, em forma de pó, é muito utilizado em tintas, explosivos e fogos de artifício (SJÖGREN *et al.*, 2007).

A forma química possui uma grande influência na toxicocinética e na toxicodinâmica deste metal. Como a maioria dos metais, as formas solúveis do alumínio são mais bem absorvidas e mais fáceis de serem distribuídas para os principais órgãos alvo. Na ausência de ligantes, o alumínio, como um hidróxido, é menos solúvel em pH 6.2 (SJÖGREN *et al.*, 2007).

O alumínio também está presente em pequenas quantidades em vários alimentos (GORMICAN, 1970; KOIVISTOINEN, 1980; SORENSON *et al.*, 1974), e compostos que possuem o alumínio como base, tanto solúveis como insolúveis, são permitidos como aditivos alimentícios em vários países (SJÖGREN *et al.*, 2007) e, por esta razão são considerados os principais meios de consumo de alumínio. Este metal possui numerosas aplicações, como por exemplo, na fabricação de utensílios de cozinha, bem como na produção de embalagens de comida e bebida. Pequenas quantidades de Al^{3+} são também liberadas de utensílios de cozinha de alumínio, e são dissolvidos na comida, particularmente quando o alimento é ácido. Além disso, uma solução concentrada de oxicloreto de alumínio é muito comumente utilizada como antitranspirante. Sais de alumínio têm sido também utilizados como antissépticos, como o acetato de alumínio. Compostos de alumínio são usados em um grande número de processos técnicos, como, por exemplo, catalisadores em indústrias químicas, em indústrias de papel e de corantes têxteis (GANROT, 1986). Especificamente sobre o sulfato de alumínio, este é

aplicado em lago e lagoas com o intuito de reduzir o desenvolvimento de fitoplâncton e consequentemente aumentar a transparência da água (WAUER *et al.*, 2004). Além disso, o Al^{3+} é comumente utilizado em purificação de água, na precipitação de sólidos em suspensão durante o tratamento de água, um processo que atua para um aumento significativo deste metal em corpos d'água (LIONE, 1983). De Voto e Yokel (1994) relataram que a adição de sulfato de alumínio durante o tratamento de água pode aumentar a concentração de alumínio de 0.016 para 1.17 mg/L.

A média de alumínio ingerido por seres humanos varia de 5 mg a 3 g por dia (GREGER, 1993). A fração de Al que atinge a circulação sistêmica e não é excretado pela urina rapidamente, se acumula em tecidos periféricos, onde se liga fortemente (WARD *et al.*, 2001). Investigações disponíveis apenas relatam a comparação entre vários tecidos, ou comparam tecidos saudáveis e doentes. Entretanto, essa padronização é muitas vezes inadequada. As provas julgadas confiáveis levam a crer que o conteúdo total no organismo humano saudável está entre 30 e 50 mg. Cerca da metade está presente no esqueleto e $\frac{1}{4}$ nos pulmões (ALFREY, 1981; ALFREY, 1984; ALFREY, HEGG e CRASWELL, 1980; BURNEL *et al.*, 1982). Com exceção dos pulmões, todo Al^{3+} no organismo provavelmente se origina da ingestão de alimentos (GANROT, 1986).

A concentração de Al^{3+} aumenta com a idade nos tecidos pulmonares (ALFREY, 1980), fígado, rins e cérebro (MARKERBERY *et al.*, 1981; TRAUB *et al.*, 1981). Como muitos outros íons metálicos, a absorção de Al^{3+} provavelmente aumenta quando substâncias complexadas adequadas também estão presentes no intestino. Íons de alumínio, como Al^{3+} , são facilmente ligados a muitas substâncias e estruturas nos organismos. Portanto, seu metabolismo é determinado por sua afinidade a cada ligante e pela sua quantidade relativa e metabolismos (GANROT, 1986). A provável participação do alumínio em algumas doenças também vem sendo discutida. Estas doenças incluem anemia, distúrbios nos ossos e principalmente desordens neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e encefalopatias (GONZÁLEZ *et al.*, 2004; JOHNSON *et al.*, 2005; VERSTRAETEN e AIMO, 2008). A distribuição intracelular do alumínio entre as organelas é variável, mas os lisossomos, mitocôndrias e núcleo são descritos como os principais sítios de ligação (DOBSON *et al.*, 1998).

O alumínio não possui importância biológica. Pelo contrário, diversos estudos apontam o alumínio como um metal indutor de toxicidade nos mais diversos modelos animais (BAZZONI *et al.*, 2005; LANKOFF *et al.*, 2006; STACCHIOTTI *et al.*, 2006; WARD *et al.*, 2006). Apesar disso, nenhum mecanismo comum a estas diferentes espécies, que explique a

neurotoxicidade, não foi proposto até o momento. A hipótese mais aceita é o modelo envolvendo a exacerbação do estresse oxidativo através do aumento na produção de ânions superóxido e da oxidação dirigida através do íon ferro (GONÇALVES e SILVA, 2007).

Em peixes, altas concentrações de alumínio podem causar mortalidade, distúrbios natatórios, pode atuar como desregulador endócrino e pode alterar diversos parâmetros hematológicos; além disso, o metal pode se depositar nas brânquias, produzindo um aumento de tipos celulares específicos, inflamação e aumento na secreção de muco, bem como pode ser incorporado ao cérebro, aonde pode dar origem a alterações ultraestruturais severas (EXLEY, 1996; ALLIN e WILSON, 2000; ROYSET *et al.*, 2005; WARD *et al.*, 2006; CORREIA *et al.*, 2010).

A maioria dos estudos sobre genotoxicidade e citotoxicidade do alumínio tem sido realizada *in vitro*. Em relação aos organismos aquáticos, estudos relatando efeitos cito e genotóxicos do alumínio são escassos (GARCÍA-MEDINA *et al.*, 2011). A cromatina e DNA são as estruturas celulares mais vulneráveis ao Al^{3+} . Seus efeitos tóxicos incluem deslocamento e/ou substituição de íons essenciais de sítios celulares e bloqueio de grupos funcionais de moléculas importantes, como enzimas, polinucleotídeos e sistemas essenciais de transporte de nutrientes (ELOVAARA *et al.*, 1995). O íon Al^{3+} possui uma alta afinidade pelo DNA, assim como ao RNA e muitos mononucleotídeos, podendo fazer ligações aos grupos fosfato. A quantidade de alumínio ligado é extremamente variável. Possivelmente, um complexo com alumínio/DNA – fosfato em uma taxa de cerca de 1:3 é inicialmente formado. Entretanto, o excesso de alumínio pode aumentar esta taxa para mais de 2:1, mais provavelmente devido à ligação de íons OH. A ligação do Al^{3+} ao DNA é fortemente estável (MATSUMOTO *et al.*, 2004).

Isto resulta na desnaturação e inativação de enzimas e ruptura da integridade da membrana de organelas celulares (OVREBO *et al.*, 1995). Sabe-se, ainda, que os metais, de modo geral, interferem na gametogênese, inibem a embriogênese, e interrompem o desenvolvimento em diferentes estágios (AU *et al.*, 2001; FERNANDEZ e BEIRAS, 2001). Muitos organismos podem ativar mecanismos de morte celular programada em resposta a excessiva acumulação de metais tóxicos (AGNELLO *et al.*, 2007; SAMALI e COTTER, 1996).

Apesar de se saber que muitos metais induzem danos ao DNA, a informação relacionada ao alumínio é escassa (LANKOFF *et al.*, 2006). Há evidências de que o alumínio induz aberrações cromossômicas, micronúcleos e troca de cromátides-irmãs em linfócitos humanos (ROY *et al.*, 1989; MIGLIORE *et al.*, 1999; BANASIK *et al.*, 2005). A forma como

o alumínio induz danos ao DNA não é conhecida, mas um mecanismo provável é a indução de danos oxidativos. A exposição ao alumínio é responsável pela promoção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica (YOUSEF, 2004). Além disso, este composto influencia a expressão gênica, altera fosforilação lipídica e inibe algumas enzimas celulares (LI *et al.*, 1998).

Alguns exemplos conclusivos de efeitos em enzimas têm sido publicados. O alumínio não possui capacidade redox em sistemas biológicos, porém é considerado um agente pró-oxidante. Vários estudos mostram que a exposição a altas concentrações de alumínio podem induzir ao estresse oxidativo, estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células (LI *et al.*, 2006; SINHA *et al.*, 2007), induzindo à peroxidação lipídica, alterando a atividade de diversas enzimas antioxidantes incluindo a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), além de promover a oxidação de proteínas (ALMROTH *et al.*, 2005; PARVEZ e RAISUDDIN, 2005; VLAHOIANNI *et al.*, 2007). O sistema nervoso é particularmente suscetível ao dano oxidativo, principalmente por que o cérebro é um órgão que consome altos níveis de oxigênio e, além disso, é um órgão muito rico em ácidos graxos poli-insaturados, possui as atividades das enzimas do sistema antioxidante com uma atividade reduzida, quando comparadas a outros tecidos, e o conteúdo de ferro é alto. Além disso, os neurotransmissores são moléculas auto-oxidáveis (VERSTRAETEN *et al.*, 2008).

Pouco se sabe a respeito do processo de bioacumulação do alumínio. Apesar de sua toxicidade em muitas espécies aquáticas, o alumínio não parece sofrer o processo de bioacumulação e, portanto, não seria considerado um componente significativo na dieta dos animais e de seres humanos que deles se alimentam (ATSDR - 2007). Porém, um estudo realizado por Oberholster e colaboradores (2011) em um lago africano, avaliando a concentração de ferro e alumínio em amostras de fitobentos, fitoplâncton, macroinvertebrados, anfíbios e peixes concluiu que na espécie de peixe avaliada (*Oreochromis mossambicus*), devido ao alto consumo de organismos bentônicos por esta espécie, houve uma bioacumulação de alumínio na cadeia alimentar e posterior desenvolvimento de consequências aos predadores de maior nível trófico. Portanto, é muito provável que o mecanismo de bioacumulação exista para este metal.

Diversos estudos têm demonstrado que o alumínio é tóxico para a fauna aquática, especialmente para os peixes, nos quais pode ocorrer dano às brânquias devido à deposição do metal e mudanças na osmorregulação, bem como estresse oxidativo nos linfócitos (GALAR-MARTÍNEZ *et al.*, 2010; GARCÍA-MEDINA *et al.*, 2010). Exley *et al.*, (1997) encontrou

que o tecido cerebral em truta arco-íris expostas ao alumínio era similar ao tecido cerebral humano de pacientes com a doença de Alzheimer. Mesmo assim, são poucos os estudos realizados com a fauna aquática após a exposição ao alumínio, utilizando biomarcadores específicos e não específicos, principalmente em peixes de interesse econômico e alimentar.

2.4 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

O aumento da produção e do uso nos mais diversos setores de diferentes tipos de nanomateriais, cujo crescimento estimado até o ano de 2020 é de um milhão e meio de toneladas, consequentemente levará a um aumento substancial na liberação destas substâncias no ambiente, principalmente no ambiente aquático (CANESI, CIACCI, BALBI, 2015). A presença dos mais diversos tipos de nanomateriais no meio aquático é seguida por inúmeras consequências, e estas imprevisíveis em sua maioria, devido à escassez de informações sobre o comportamento destes materiais quando atingem o ambiente aquático (KRYSANOV *et al.*, 2010). Infelizmente, o desenvolvimento de nanotecnologias ainda apresenta dados variados e contraditórios de avaliação do impacto sobre o meio ambiente, plantas, animais e seres humanos (ANDRIEVSKY *et al.*, 2005; OBERDORSTER *et al.*, 2005 a, b; OBERDORSTER 2007; KOLESNICHENKO *et al.*, 2008).

A nanotecnologia envolve a produção de diversos tipos de nanomateriais (NM), que incluem os nano-objetos e as nanopartículas (NP). Os nanomateriais possuem pelo menos uma dimensão menor do que 100 nm, enquanto que os nano-objetos possuem duas dimensões menores do que 100 nm, como por exemplo, os nanotubos de carbono, e as nanopartículas que são definidas como partículas com as três dimensões menores do que 100 nm (BRITISH STANDARDS, BSI, 2007; STONE *et al.*, 2010).

As nanopartículas estão agrupadas de acordo com sua composição química, como os nanomateriais de carbono (fulerenos e nanotubos), óxidos metálicos (por exemplo, TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 , SiO_2 , CeO_2), nanomateriais metálicos (por exemplo, Au e Ag), semicondutores (*quantum dots*) e nanomateriais orgânicos poliméricos (JU-NAM e LEAD, 2008). Devido ao seu tamanho reduzido, as nanopartículas exibem uma área de superfície relativamente maior do que as formas convencionais dos materiais; além disso, o tamanho reduzido frequentemente resulta em uma alta reatividade, em uma alteração nas propriedades de superfície que podem ser exploradas em uma grande variedade de produtos como tintas, cosméticos, medicamentos e alimentos, tornando-se potencialmente atrativas em tecnologias de remediação de ambientes poluídos, porém, podem causar um elevado prejuízo para o meio

ambiente e para os seres vivos (OBERDÖRSTER *et al.*, 2005; BORM *et al.*, 2006; KREYLING *et al.*, 2006; LAM *et al.*, 2006; MAYNARD, 2007; STONE *et al.*, 2010; SANCHEZ *et al.*, 2011).

O comportamento químico no ambiente e a ecotoxicidade das nanopartículas manufaturadas são constantemente revisadas (HANDY *et al.*, 2008). Este comportamento químico compartilha algumas semelhanças superficiais com o comportamento químico dos metais como, por exemplo, pH, a presença de íons divalentes, e a força iônica que pode influir o comportamento coloidal, e de agregação, das nanopartículas. No entanto, as razões para essas interações são muitas vezes fundamentalmente diferentes daquelas para os metais dissolvidos. Modelos atuais de especiação de metais são modelos de equilíbrio, ao passo que o comportamento das nanopartículas é descrito de uma maneira muito diferente, como sendo um processo dinâmico, onde o sistema é dependente da quantidade de energia adicionada à dispersão de nanopartículas e de suas propriedades físico-químicas (o que é chamado de teoria DLVO; HANDY *et al.*, 2008a). Estas propriedades físico-químicas incluem tamanho de partícula, forma e a carga superficial (frequentemente mensurada como potenciais zeta). A capacidade de uma partícula de um coloide agregar-se com outra partícula dependerá dessas propriedades, bem como da energia cinética dessas partículas, da viscosidade da água e de qualquer arraste sobre as partículas, da presença de outros materiais em corpos d'água, tais como pequenos peptídeos (resíduos bacterianos, por exemplo) ou macromoléculas (ácidos húmicos, por exemplo) que podem provocar um impedimento da interação entre as partículas. Claramente, este comportamento químico das nanopartículas difere dos modelos de especiação de metais aos quais os pesquisadores estão mais familiarizados (SHAW e HANDY, 2011).

No entanto, existem também alguns pontos em comum. Um conceito em toxicidade de nanopartículas é que a toxicidade pode ser relacionada com a química da superfície das partículas. A agregação química será útil para prever a área de superfície efetiva do material no contexto de potencial de interação com o organismo, mas a química da superfície (reatividade) pode informar sobre a toxicidade. Estas ideias ainda não são comprovadas por dados experimentais, mas, por exemplo, pode-se esperar que uma partícula com uma superfície de metal oxidante possa causar estresse oxidativo em um organismo. Este é certamente o caso relatado por pelo menos um tipo de nanopartícula de dióxido de titânio, que foi responsável pelo estresse oxidativo em trutas (FEDERICI *et al.*, 2007). Assim, talvez a reatividade do metal, em vez de a concentração do íon metálico livre, venha a ser mais importante a se considerar, no caso das nanopartículas. No entanto, há um cenário em que

podemos aplicar modelos de íons metálicos livres, com algumas modificações. Alguns tipos de nanometais irão liberar (embora lentamente ao longo de várias horas ou dias) por dissolução de íons de metal a partir da superfície da partícula. Este é provavelmente o caso para nano-prata e nano-cobre em água doce (SHAW e HANDY, 2011).

O mecanismo de internalização celular de nanopartículas varia de partícula para partícula, dependendo principalmente da carga e do tamanho. O mecanismo principal ocorre por endocitose, mediada por proteínas presentes na membrana celular, como clatrina e caveolina, sendo que partículas com 50 nm de tamanho são mais rapidamente internalizadas comparando com partículas menores (abaixo de 14 nm) e maiores (até 500 nm) (REJMAN *et al.*, 2004; CHITHRANI *et al.*, 2006).

Com relação à regulamentação do uso de nanopartículas, no Brasil, dois projetos de lei, apresentados pelo deputado José Sarney filho tramitam no Congresso Nacional desde 2013, com o intuito de criar e regulamentar o uso da nanotecnologia e seus resíduos (TABELA 1). Além disso, a portaria nº993/ANVISA de 10 de junho de 2013 instituiu o Comitê Interno de Nanotecnologia – CIN, dentro da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), com o intuito de elaborar um diagnóstico institucional sobre a dimensão da nanotecnologia dentro desta agência de regulação, bem como elaborar um documento sobre as ações e políticas regulatórias que estão sendo adotadas por outros países com relação à nanotecnologia.

TABELA 1 - PROJETOS DE LEI APRESENTADO NO CONGRESSO NACIONAL COM O OBJETIVO DE LEGISLAR SOBRE AS NANOTECNOLOGIAS. FONTE: SITE CÂMARA DOS DEPUTADOS, PUBLICADO EM 2013.

PROJETO DE LEI	PROPONENTE	EMENTA	STATUS
Nº 6.741/2013	Deputado Sarney Filho	Dispõe sobre a Política Nacional de Nanotecnologia, a pesquisa, a produção, o destino de rejeitos e o uso da nanotecnologia no país, e dá outras providências.	Em tramitação
Nº 5133/2013	Deputado Sarney Filho	Regulamenta a rotulagem de produtos da nanotecnologia e de produtos que fazem uso da nanotecnologia	Em tramitação
Nº 131/2010 (Senado)	Senador Tião Vianna	Altera o Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, que institui normas básicas sobre alimentos, e a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências, para determinar que rótulos, embalagens, etiquetas, bulas e materiais publicitários de produtos elaborados com recurso à nanotecnologia contenham informação sobre esse fato.	Arquivado
Nº 5.076/2005	Deputado Edson Duarte	Dispõe sobre a pesquisa e o uso da nanotecnologia no País, cria Comissão Técnica Nacional de Nanosseguurança - CTNano, institui Fundo de Desenvolvimento de Nanotecnologia	Arquivado

Fonte: site câmara dos deputados, publicado em 2013.

2.4.1 Nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂)

O dióxido de titânio, também conhecido como óxido de titânio (IV), titânia e TiO₂, é um óxido de titânio de ocorrência natural. Um dos seus usos é como pigmento branco e, neste caso, é conhecido como titânio branco ou como pigmento branco 6. Existem três polimorfos de titânia: anatase, rutilo e broquite, sendo o rutilo o tipo mais comum deles (MENARD *et al.*, 2003)

A principal diferença entre estas formas de titânia encontra-se na simetria de seus cristais. Titânia é um excelente pigmento branco por causa de seu brilho e de seu alto índice de refração. Ele é utilizado para fornecer a cor branca e a opacidade em tintas, revestimentos, plásticos, corantes, em alimentos (corante alimentar E171) e em cremes dentais (AITKEN *et al.*, 2006; JIN *et al.*, 2007). As nanopartículas de dióxido de titânio também podem ser encontradas em filtros solares, devido a sua capacidade de absorver os raios UV (JAROENWORALUCK *et al.*, 2005); também podem ser utilizadas como catalisadores, e ser utilizado na presença de radiação ultravioleta, para catalisar a reação de vários compostos e, portanto, possui diversos usos no tratamento de águas residuais e nas tintas anti-incrustantes (CHO *et al.*, 2004; HIRAKAWA *et al.*, 2004; GURR *et al.*, 2005).

Uma lista atualizada dos produtos que contém as nanopartículas de dióxido de titânio pode ser encontrada no trabalho de SHAW e HANDY (2011). Essas nanometálicas estão presentes em tintas, protetores solares, cosméticos, capacitores, materiais de construção, catalisadores, depuradores de ar, anti-bactericidas, anti-virais, anti-fúngicos e anti-algas, revestimento de pisos e banheiras e equipamentos esportivos.

A propriedade redox do dióxido de titânio é toxicologicamente relevante, com particular referência ao estresse oxidativo na biota (GURR *et al.*, 2005). Na presença de matéria orgânica (fonte de carbono) e de radiação UV, as nanopartículas de TiO₂ atuam como catalisadores na produção de espécies reativas de oxigênio e de água (UCHINO *et al.*, 2002; REEVES *et al.*, 2008).

Entre os anos de 2000 - 2010 ocorreu um grande e crescente desenvolvimento de diversos estudos sobre os efeitos das nanopartículas de dióxido de titânio. No início, os primeiros trabalhos realizados foram em sua maioria *in vivo*, utilizando camundongo, ratos e *hamsters* (BERMUDEZ *et al.*, 2004; WARHEIT *et al.*, 2005; WARHEIT *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007; WARHEIT *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2011) e invertebrados (LOVERN e KLAPER, 2006), juntamente com estudos *in vitro* com células humanas (GURR *et al.*, 2005;

HUSSAIN *et al.*, 2009) e linhagens celulares de rato (XU *et al.*, 2009). Estes trabalhos iniciais centraram-se basicamente sobre os efeitos ocasionados pelo tamanho das partículas, na área de superfície, na forma do cristal e nas propriedades de superfície sobre a toxicidade, com algumas revisões sugerindo que as nanopartículas de menor escala teriam um efeito inflamatório maior do que as nanopartículas maiores (DONALDSON *et al.*, 2001; OBERDORSTER *et al.*, 2005). Desde então, os efeitos do tamanho relacionados à toxicidade ainda continuam a ser examinados tanto *in vitro* como *in vivo*. Se o aumento de toxicidade observado em testes utilizando nanopartículas de TiO₂ de diferentes tamanhos é resultado de um aumento da área de superfície da partícula ou devido a qualquer outra propriedade físico química inerente a elas, isso ainda permanece pouco claro dentro dessa área de estudo.

Também de interesse para a área de toxicologia é a questão da toxicidade causada por estresse oxidativo e a consequente geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). GURR *et al.* (2005) demonstraram em seu trabalho que as nanopartículas de TiO₂ (10 e 20 nm – anatase) foram responsáveis pela geração de EROs em células epiteliais de brônquios humanos, verificados pelo aumento da peroxidação lipídica e dos níveis de EROs que foram mensurados. É importante ressaltar que esta geração de EROs ocorreu na ausência de radiação UV. Por outro lado, um estudo que utilizou uma linhagem celular da pele de *goldfish* (linhagem conhecida como GSFk-1) relatou a exposição às nanopartículas de TiO₂ isoladas não resultou em uma toxicidade significativa. Apenas quando estas células foram expostas em conjunto com a radiação UVA houve um aumento dose-dependente na toxicidade, que pode ser evidenciado por uma diminuição na viabilidade celular (REEVES *et al.*, 2008). Um terceiro estudo realizado por Vevers e Jha (2008) utilizou uma linhagem celular gonadal de truta arco-íris (linhagem conhecida como RTG-2) com o intuito de verificar os efeitos dos raios UVA sobre a toxicidade das nanopartículas de TiO₂. A toxicidade foi observada mesmo em células expostas às nanopartículas de TiO₂ na ausência de radiação UVA, mas um aumento de danos ao DNA pode ser verificado quando as células foram expostas às nanopartículas de TiO₂, em combinação com a radiação UVA. A geração de EROs também pode ser afetada pela presença de matéria orgânica. Hussain *et al.* (2009) evidenciaram em seu estudo em uma linhagem de células epiteliais brônquicas humanas a presença significativa de EROs, apenas quando em conjunto com as células. Ensaio livres de células resultaram em nenhuma produção significativa de EROs. A questão de a matéria orgânica estar envolvida na geração de EROs pela exposição às nanopartículas de TiO₂ também foi sugerida por Vevers e Jha (2008).

Os estudos *in vivo* realizados em peixes possuem alguns relatos semelhantes. Exposições aquosas a nanopartículas de TiO₂ em carpas (HAO *et al.*, 2009) e truta arco-íris (FEDERICI *et al.*, 2007) e uma exposição via-trófica em truta arco-íris (RAMSDEN *et al.*, 2009) mostraram toxicidade em maior ou menor nível. A primeira manifestação de toxicidade em exposições hídricas pode ser esperada para as brânquias. Isto foi realmente verificado tanto para as carpas quanto para as trutas, nas quais foi possível verificar danos nas brânquias e elevadas taxas de ventilação, em ambos os estudos (FEDERICI *et al.*, 2007; HAO *et al.*, 2009). Além disso, estresse oxidativo também foi registrado nestes estudos e no estudo de Ramsden *et al.* (2009), o qual, juntamente com Federici *et al.* (2007) verificaram uma redução significativa na Na⁺K⁺ - ATPase nas brânquias, no intestino e no cérebro dos peixes expostos, respectivamente. Mudanças nos substratos reativos ao ácido tiobarbitúrico (ensaio *TBARS*) que avalia a peroxidação lipídica, também foram verificadas nestes dois estudos. Hao *et al.* (2009) relataram estresse oxidativo em carpas expostas a 100 e 200 mg L⁻¹ de nanopartículas de TiO₂, fato que pode ser verificado pela redução significativa na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT).

Os três estudos descritos acima indicam que a toxicidade crônica em vez de aguda é causa de preocupação em peixes. Embora a toxicidade individual não seja uma preocupação primária, é possível que as pressões fisiológicas induzidas pela exposição às nanopartículas de TiO₂, como evidenciado pelas alterações bioquímicas descritas acima, pode resultar no comprometimento da saúde dos animais durante longos períodos de tempo, diferente dos que estão descritos na literatura até o momento. Esta informação ainda é apoiada pelas conclusões do trabalho realizado por Scown e colaboradores (2009). Neste trabalho, os autores realizaram uma injeção intravenosa de nanopartículas de TiO₂ em truta arco-íris. Embora nenhuma toxicidade significativa tenha sido observada no pequeno número de ensaios efetuados, verificou-se que as nanopartículas estavam presentes mesmo 90 dias após a injeção. Este fato sugere que, apesar do potencial oxidativo das nanopartículas, este pode não ser visível em ensaios agudos, porém é possível depois de longos períodos de tempo verificar um comprometimento da saúde dos peixes pela presença dessas partículas.

Embora existam vários estudos que mostram diferentes níveis de toxicidade das nanopartículas de TiO₂ em uma grande variedade de espécies e linhagens celulares, há outros dados que sugerem que as nanopartículas de TiO₂ podem desenvolver pouca ou nenhuma toxicidade (HUSSAIN *et al.*, 2005; WARHEIT *et al.*, 2006; GRIFFITT *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2008; GRIFFITT *et al.*, 2009; SCOWN *et al.*, 2009). Existem algumas questões em torno da agregação de nanopartículas de TiO₂ e a formação de coloides com a matéria orgânica no

ambiente natural (LOVERN e KLAPER, 2006; HANDY *et al.*, 2008c) as quais sugerem que, sob condições ambientais realistas, o nível de toxicidade causada por nanopartículas de TiO₂ pode ser negligenciável. Além disso, as partículas finas de dióxido de titânio são utilizadas como um marcador de digestibilidade em peixes há muitos anos (WEATHERUP e MCCracken, 1998). Embora a preocupação sobre a toxicidade de nanopartículas surgiu principalmente devido às propriedades em nanoescala (COLVIN, 2003), não houve nenhuma evidência consistente de uma relação entre quaisquer características da nanoescala e as respostas toxicológicas em peixes (PETERSEN E HENRY, 2012).

Se as nanopartículas de TiO₂ são absorvidas ou não pelos organismos e pelas células, essa é outra questão que ainda permanece pouco clara e é possível que os efeitos descritos anteriormente sejam efeitos secundários da exposição às nanopartículas em vez de uma toxicidade direta, causada pela presença das mesmas nos tecidos. Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) não foi detectada acúmulo de nanopartículas de TiO₂ em órgãos internos (FEDERICI *et al.*, 2007; JOHNSTON *et al.*, 2010). Já em carpas (*Cyprinus carpio*), houve acúmulo de titânio no músculo e no fígado quando expostos às nanopartículas de dióxido de titânio por via hídrica (SUN *et al.*, 2007). Essas evidências conflitantes não são facilmente esclarecidas devido à grande diversidade no tipo de partículas, de preparação e de meios de exposição a elas. Como resultado, fazer associações entre diferentes estudos, com resultados adversos é um desafio dentro da nanotoxicologia, pelas seguintes razões: (a) existe uma variação no tamanho das nanopartículas; (b) existem variações na distribuição de tamanho; (c) existem variações na pureza dos nanomateriais utilizados; (d) variações nas superfícies de materiais com o mesmo tamanho médio também podem ocorrer; (e) diferentes materiais podem recobrir as nanopartículas; (f) existem algumas diferenças na estrutura cristalina dentro de um mesmo tipo de nanomaterial; (g) diferenças nos tamanhos dos agregados formados em solução/meio; (h) diferenças entre os ensaios realizados e finalmente (i) diferentes concentrações de nanomateriais são utilizadas para cada ensaio (GOLBAMAKI *et al.*, 2015).

Deste modo, fica claro que, embora haja um conjunto significativo de evidências indicando o potencial tóxico das nanopartículas de TiO₂, há também um número de estudos relevantes que indica o contrário. Todos estes estudos demonstram a necessidade de um número maior de investigações sobre os efeitos tóxicos das nanopartículas de TiO₂. Além disso, embora existam evidências conflitantes sobre o nível de toxicidade das nanopartículas de TiO₂, ainda há muito trabalho a ser feito para fornecer dados suficientes para protocolos de regulamentação destas nanopartículas.

2.4.2 Nanopartículas de prata (AgNPs)

As nanopartículas de prata são amplamente utilizadas na medicina, na física, ciências dos materiais e na química. Muitos medicamentos são revestidos ou embebidos com nanopartículas de prata, como por exemplo, dispositivos de contracepção, instrumentos cirúrgicos, próteses ósseas e ligas dentárias.

No entanto, pouco se sabe sobre seu comportamento *in vivo*, distribuição nos tecidos, bem como os efeitos adversos para a saúde em mamíferos, incluindo seres humanos. Por estarem presentes nos mais diversos produtos de utilização humana, as nanopartículas de prata podem penetrar no corpo humano através de diferentes portas, como por exemplo, através de inalação, ou podem ser diretamente absorvidos de produtos médicos, como por exemplo, cateteres e implantes ósseos. As AgNPs presentes em curativos para queimaduras e bandagens e pomadas, utilizadas para a cicatrização de ferimentos, produtos têxteis à base de nanopartículas de prata, e cosméticos (como desodorizantes com proteção antibacteriana, por exemplo) podem penetrar tanto na pele comprometida quanto na pele íntegra e podem localizar-se no estrato córneo e em camadas superiores da epiderme. Estes resultaram levantaram uma preocupação com o uso generalizado de AgNPs em vários produtos de consumo humano (FARKAS *et al.*, 2011).

Atualmente, não há nenhuma evidência para sugerir que os seres humanos estão sendo prejudicados pela AgNPs através da sua utilização em produtos de consumo, mas as AgNPs contidas nos produtos são susceptíveis de resultarem em prata dissolvida e AgNPs liberadas para o meio ambiente (BENN e WESTERHOFF, 2008; GERANIO *et al.*, 2009; GOTTSCHALK *et al.*, 2009; WOODROW e WILSON, 2009), que tendem a persistir e bioacumular, ou ainda, entrar na cadeia alimentar ou no abastecimento de água potável. O impacto ambiental da nanopartícula de prata irá depender da natureza dessas nanopartículas. As nanopartículas que se agregam e /ou se associam com materiais dissolvidos ou materiais naturalmente particulados vão acabar depositadas em solos e sedimentos. Alguns tipos de AgNPs são fabricados com o intuito de permanecerem dispersas na água. A biodisponibilidade destes materiais pode ser determinada pela sua absorção quando em contato com os organismos. A ameaça potencial e persistência dessas partículas, em escalas de tempo que tenham uma relevância ambiental (dias a anos), ainda não são completamente conhecidas.

Os impactos ambientais da AgNPs são, por enquanto, desconhecidos. No entanto, o conhecimento prévio sobre as implicações ambientais e fisiológicas da exposição a íons de

prata e sais de prata dissolvida, nos organismos de água doce e marinhos, fornece uma linha de partida para avaliação e por isso é motivo de preocupação. A partir desta linha é possível prever os efeitos e impactos da AgNPs nos organismos e aos ecossistemas. Antes do interesse nas nanopartículas de prata, o íon prata ($\text{Ag}^+_{(\text{aq})}$) foi considerado a forma mais tóxica de prata em corpos d'água (RATTE, 1999). Tal como acontece com todos os metais, a química do ambiente circundante afeta a associação de íons de prata com vários ligantes, e por sua vez, influencia a biodisponibilidade e a toxicidade deste metal (ADAMS e KRAMER, 1998; ERICKSON *et al.*, 1998; LUOMA *et al.*, 1995). Por exemplo, em ecossistemas de água doce, a matéria orgânica e o sulfeto, possuem uma afinidade elevada à prata, e provavelmente dominem a especiação do Ag e reduzam a sua biodisponibilidade. Em ecossistemas marinhos, o complexo formado entre o cloro e a prata é altamente biodisponível e é a forma primária em águas de salinidade igual ou superior a 3 (LUOMA, 2008; LUOMA *et al.*, 1995). As taxas de absorção dos complexos de cloro por peixe não são tão rápidas como as do íon Ag livre, mas as concentrações dos complexos de cloro são muito maiores do que as concentrações de íons Ag livres na maioria dos ecossistemas aquáticos. Assim, os organismos marinhos são mais susceptíveis à bioacumulação aos íons de prata do que os organismos de água doce (LUOMA, 2008), se considerarmos condições de contaminação equivalentes.

Em organismos aquáticos, a maioria dos dados existentes pertence a uma variedade de espécies de peixes, incluindo a fase larval e a fase adulta. As AgNPs são relatadas na literatura como responsáveis por afetar o desenvolvimento embrionário de *zebrafish* (*Danio rerio*) (YEO e KANG, 2008; LEE *et al.*, 2007). Efeitos como o retardo no desenvolvimento, o aumento dos batimentos cardíacos, efeitos no desenvolvimento neurológico, circulação lenta, edema do pericárdio, coração em tubo, malformações nos olhos, são resultado da exposição embrionária às AgNPs (WU *et al.*, 2010; YEO e KANG, 2008;). Edema também foi uma malformação mais proeminente em embriões de *Pimephales promelas* após a exposição das larvas às AgNPs (LABAN *et al.*, 2010). Os efeitos foram atribuídos tanto a exposição às AgNPs, como à toxicidade dos íons Ag formados durante a dissolução das nanopartículas, efeito verificado através da captação de AgNPs em embriões de peixe (LEE *et al.*, 2010) e captação de íons Ag em meio de cultura (LABAN *et al.*, 2010).

Em peixes-zebra adultos, não havia evidência de absorção de AgNPs através das brânquias, mas que causaram mudanças específicas na expressão genética deste tecido (GRIFFITT *et al.*, 2009), e resultou em um aumento da mortalidade (GRIFFITT *et al.*, 2008). O aumento da mortalidade depois da exposição à AgNPs também foi observado em *medaka*

adultos (*Oryzias latipes*) (WU *et al.*, 2010), acompanhado de indução de danos no DNA (CHAE *et al.*, 2009).

A exposição de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) às AgNPs causou um aumento na expressão do gene CYP1A2 nas brânquias (SCOWN *et al.*, 2010).

Não se pode excluir a ideia de que AgNPs são parcialmente degradadas *in vivo*, causando, assim, a exposição ao íon Ag (BAR-ILAN *et al.*, 2009). Curiosamente, perfis de expressão genética em peixes após a exposição ao íon Ag e à AgNP, mostrou pouca semelhança, proporcionando impressões digitais de toxicidade distinguíveis entre os íons Ag quando comparados às AgNPs (GAISER *et al.*, 2009; CHAE *et al.*, 2009). Este resultado acrescenta mais evidências de que as AgNPs podem induzir diretamente danos em organismos expostos e que essas respostas biológicas não são induzidas apenas por íons Ag dissolvidos, como muitas vezes sugerido. As AgNPs também agem como desreguladoras da função iônica em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) por inibição, nas brânquias, da Na⁺ K⁺ ATPase (SCHULTZ *et al.*, 2012) e podem também acumular no fígado de truta arco-íris expostas às AgNPs (GAGNÉ *et al.*, 2012), sugerindo que algumas dessas partículas podem passar através das brânquias e, utilizando o sangue como carreador, acumular no fígado.

Os estudos relativos à toxicidade a nível celular e molecular são bastante limitados e os mecanismos relacionados à toxicidade das AgNPs estão longe de serem compreendidos, apesar do fato de que as AgNPs estão entre os nanomateriais mais comercializados no mundo. Além de seu efeito antimicrobiano, as AgNPs são conhecidas como indutoras de toxicidade em muitas outras espécies diferentes (BILBERG *et al.*, 2011; NAVARRO *et al.*, 2008) e a exposição crônica é conhecida por causar argiria e/ou argiríase em seres humanos (como revisto em DRAKE e HAZELWOOD, 2005), uma condição irreversível na qual a deposição de íons de prata nos tecidos corporais resulta na coloração azul-arroxeadada da pele (HILL, 1941; ROSENMAN *et al.*, 1979). Além disso, existe um impacto em potencial na microflora intestinal, que pode afetar a população de certos tipos de bactéria que ali habitam (SAWOSZ *et al.*, 2007).

A absorção de AgNPs pelas células é relativamente rápida e dependente do tempo. Normalmente depois de 2 horas de exposição, a grande maioria das células já contém AgNPs. Por vezes, a saturação de absorção é observada após incubação prolongada (GAISER *et al.*, 2009; SIRIMUTHU *et al.*, 2010). A saturação de absorção das nanopartículas foi alcançada depois de 7 horas para diferentes formas de AgNPs (coloidais e em pó, esferas coloidais e prismas em pó) com dimensões semelhantes. A cinética de absorção de todas as formas foi bastante similar. Em contraste, a carga da superfície das AgNPs modificou significativamente

a sua absorção. A internalização de complexos de nanopartículas de prata carregadas positivamente ou negativamente (3-7 nm) ou de AgNPs funcionalizadas com tamanho de 50 nm, foi mais eficaz do que a internalização de nanopartículas de prata neutras (LESNIAK *et al.*, 2005; GREGAS *et al.*, 2010)

As nanopartículas e os componentes celulares compartilham um tamanho similar, e, portanto, é muito provável que as AgNPs possam interagir com células e cruzar barreiras, como as membranas celulares e de organelas, resultando potencialmente em efeitos adversos e imprevisíveis. As nanopartículas, de modo geral, são absorvidas por uma variedade de tipos de células diferentes através de mecanismos, tais como macropinocitose, transportes dependentes de endocitose (caveolina dependente, dinamina dependente, dinamina independente), endocitose dependente de clatrina, e fagocitose (GEISER *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2009). Apesar do fato de que esses mecanismos são extensivamente estudados para elaborar a absorção de outras moléculas biologicamente ativas, como vírus, proteínas e o DNA, o mecanismo exato de absorção de AgNPs não é completamente compreendido. Acredita-se que diferentes tipos celulares podem ter diferentes mecanismos de absorção. Além disso, o mecanismo de absorção de nanopartículas pode ser influenciado por vários fatores, tais como a morfologia das mesmas, o seu tamanho, a concentração e as propriedades de superfície (MAILANDER *et al.*, 2009). Algumas tentativas de se identificar as rotas de captação das AgNPs levaram à conclusão de que elas são internalizadas principalmente através de endocitose e macro-pinocitose dependente de clatrina.

A toxicidade das AgNPs também tem sido demonstrada por vários estudos *in vitro* (FOLDBJERG *et al.*, 2011, 2009; KAWATA *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009). Investigações toxicológicas de nanopartículas implicam em que, por exemplo, tamanho, forma, composição química, carga superficial, a solubilidade, a sua capacidade de se ligar e afetar sítios biológicos, bem como o seu metabolismo, pode influenciar na excreção e na toxicidade das nanopartículas (CASTRANOVA, 2011; SCHRAND *et al.*, 2010). Uma vez internalizadas, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) pode fornecer informações mais detalhada sobre a absorção das nanopartículas e sobre a localização *in vitro*, permitindo a visualização e localização dentro de uma célula ou de tecido e, em conjunto com métodos espectroscópicos, a caracterização da composição das nanopartículas internalizadas. O uso de microscopia confocal de fluorescência e de laser na detecção de nanopartículas também tem permitido aos pesquisadores rastrear os caminhos percorridos por AgNPs individuais dentro de tecidos e de células isoladas e vivas.

Estudos *in vitro* descrevem resultados de efeitos toxicológicos após a exposição à nanopartículas de prata, com a AgNP sendo considerada tóxica ao fígado de rato (linhagem BRL3A), pelo aumento de formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HUSSAIN *et al.*, 2005). As AgNPs também se mostraram genotóxicas a outros dois tipos de linhagens celulares humanas: IMR-90 e Hep-G2 (ASHARANI *et al.*, 2009; KAWATA *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* com células de peixes utilizam tanto linhagens celulares como células primárias na avaliação dos efeitos das AgNPs. O uso de hepatócitos primários de truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) foi utilizado como modelo *in vitro* para a avaliação de toxicidade de nanopartículas de prata e ouro (FARKAS *et al.*, 2010), evidenciando uma redução na integridade das membranas e redução da atividade celular metabólica de um modo concentração-dependente, após exposição às AgNPs. Outro estudo mostrou a toxicidade de nanoesferas de prata, que apresentaram efeitos cito e genotóxicos em uma linhagem celular derivada da nadadeira de *medaka* (*Oryzias latipes*) (WISE SR *et al.*, 2010).

Mais recentemente, outros estudos *in vitro* utilizando células de peixes foram publicados, com os mais diversos tipos de nanopartículas de prata. Farkas *et al.*, (2011) utilizando células primárias de brânquias de truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) testaram dois tipos de AgNPs recobertas com citrato (CIT) e polivinilpirrolidona (PVP), respectivamente, bem como o íon prata em sua forma AgNO_3 . Neste trabalho, os autores verificaram uma toxicidade moderada para todos os tratamentos, com diferentes concentrações de cada tipo de prata, bem como um aumento nos níveis de glutathione em relação ao grupo controle negativo, apontando para uma possível reação de compensação. Além disso, os autores verificaram uma diferença de *uptake* entre os diferentes tipos de AgNPs: a nanopartícula recoberta com citrato foi mais rapidamente absorvida do que a nanopartícula recoberta com PVP. Ao contrário do que foi visto para as células das brânquias, Massarsky *et al.* (2014) avaliando hepatócitos e eritrócitos de truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*), após exposição às AgNPs e a íons Ag^+ verificou uma citotoxicidade similar entre as duas substâncias pois ambas geraram espécies reativas de oxigênio, diminuição dos níveis de glutathione, e diminuição da atividade de glutathione redutase e glutathione S transferase. No entanto, os dois tipos de prata mostraram diferentes alvos celulares: as AgNPs aumentaram a peroxidação lipídica sem aparente entrada nas células, enquanto que os íons de prata aumentaram o dano ao DNA.

Taju *et al.* (2014) sintetizaram e caracterizaram um tipo diferente de AgNP, estabilizada através de quitosana. Depois, desenvolveram estudos com o objetivo de avaliar o efeito citotóxico desta nanopartícula, bem como dos íons Ag^+ em diferentes linhagens

celulares de peixes: linhagem SICH, desenvolvida a partir do coração de *Catla catla*; ICG, desenvolvida a partir de brânquias de *Catla catla*; e LRG, desenvolvida a partir de brânquias de outra espécie de peixe, *Labeo rohita*. Os resultados deste estudo mostram que os danos ao DNA mensurados pelo ensaio cometa foram dose-dependente e mais proeminente nas células SICH, ICG e LRG. Já os resultados dos parâmetros antioxidantes obtidos mostraram um aumento significativo da peroxidação lipídica e uma diminuição dos níveis de GSH, SOD e CAT nas linhagens celulares SICH, ICG e LRG após a exposição às AgNPs de modo dependente da concentração. Com o intuito de avaliar o processo de internalização e toxicidade das nanopartículas de prata recobertas por citrato (CIT) utilizando células de peixes, Yue *et al.* (2014) avaliou a influência da composição do meio de cultura em uma linhagem celular de brânquias de truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*), RTgill-W1. Neste estudo, a integridade da membrana lisossomal foi mais sensível a exposição à AgNP_{cit} do que à atividade metabólica celular ou à integridade da membrana plasmática, e neste caso, mostrou possuir uma proteção menor aos íons de prata.

A grande área de superfície de nanopartículas metálicas aumenta o potencial de que íons metálicos sejam liberados dessas nanopartículas (MUDUNKOTUWA e GRASSIAN, 2011; BIAN *et al.*, 2011), mesmo ainda não sendo claro qual o nível da toxicidade das nanopartículas de prata em si e quanto desta toxicidade é relativa aos íons de prata liberados por estas nanopartículas. Kim *et al.* (2009) sugeriram que a toxicidade de AgNPs deve-se principalmente ao stress oxidativo e a toxicidade destas nanopartículas seria independente dos íons de prata. Outros autores relataram que o teor de íons de prata medidos nas suspensões de AgNPs não poderiam explicar completamente a toxicidade observada da suspensão AgNPs e que ambos devem contribuir para a toxicidade (KAWATA *et al.*, 2009; NAVARRO *et al.*, 2008). Embora estes relatos sejam até certo ponto conflitantes, todas as evidências sugerem que os íons de prata contribuem com uma porcentagem da toxicidade do AgNPs.

2.4.3 Associação entre nanopartículas e metais

Devido às propriedades únicas inerentes as nanopartículas, quando estas são lançadas ao ambiente aquático, as consequências podem ser tanto benéficas quanto maléficas. Tanto na coluna d'água quanto no sedimento, as nanopartículas podem misturar-se e interagir com outros componentes, não somente aqueles que estão dissolvidos, mas também com a matéria orgânica particulada, com contaminantes orgânicos hidrofóbicos e com íons inorgânicos,

incluindo os metais (MAURER-JONES *et al.*, 2013; BAKER *et al.*, 2014; CORSI *et al.*, 2014; GRILLO *et al.*, 2014; CANESI, CIACCI, BALBI, 2015).

A absorção de metais pelas células é mediada por transportadores de íons na membrana biológica (BURY *et al.*, 2003; HANDY e EDDY, 2004; BURY e HANDY, 2010), enquanto que o mecanismo utilizado para a captação de nanopartículas provavelmente é a endocitose, por serem partículas de maior tamanho (CAMPBELL e STOKES, 1985; CAMPBELL, 1999; ESCHER e SIGG, 2004).

Limbach *et al.* (2007) foi um dos primeiros estudos a postular sobre o que chamou de efeito “cavalo de Tróia” (do inglês *Trojan horse effect*), que seria a entrada facilitada nas células de moléculas tóxicas que estariam adsorvidas às nanopartículas. Baun *et al.* (2008) estendeu esse conceito a um contexto ambiental, recomendando que a avaliação de risco das nanopartículas deveria considerar não apenas a sua toxicidade inerente, mas também considerar possíveis interações com contaminantes ambientais, que podem levar a mudanças na biodisponibilidade, na bioconcentração e na toxicidade. Isto pode levar a diferentes resultados e diferentes tipos de interação com outros contaminantes e em diferentes organismos, com uma infinidade de resultados possíveis (efeitos aditivos, sinergia ou antagonismo) em diferentes níveis de organização biológica.

Há evidências que nanopartículas podem carrear metais, ou seja, quando ocorre uma sinergia entre nanopartículas e metais, estes têm a capacidade de adsorção à superfície de algumas nanopartículas (HANDY *et al.*, 2008b). Em experimentos com carpas, em que foi realizada exposição concomitante de nanopartículas de TiO₂ e cádmio, os peixes acumularam 146% mais metal quando comparados aos peixes expostos com o cádmio somente (ZHANG *et al.*, 2007). O mesmo aconteceu com o metal arsênio, que na presença de nanopartículas de TiO₂, os peixes acumularam 132% mais metal comparados àqueles expostos na mesma concentração apenas de arsênio (SUN *et al.*, 2007).

Os efeitos biológicos de mistura de contaminantes são geralmente difíceis de prever e, quando um destes contaminantes é um nanomaterial, com características peculiares próprias, com diferentes tipos de comportamento em diferentes meios e diversos tipo de possíveis de interação com outros contaminantes, o desafio se torna ainda maior. Entretanto, nos últimos anos, muitas tentativas têm sido realizadas com o intuito de entender se a descarga de nanopartículas no ambiente aquático na presença de outros contaminantes pode representar um risco à saúde dos ecossistemas (CANESI, CIACCI, BALBI, 2015).

2.5 ASPECTOS SISTEMÁTICOS E ECOLÓGICOS DE *HOPLIAS INTERMEDIUS*

FILO – Chordata

SUBFILO – Vertebrata

SUPERCLASSE – Pisces

CLASSE – Osteichthyes

SUBCLASSE – Actinopterygii

INFRACLASSE – Teleostei

SUPERORDEM – Osthariophysi

SÉRIE – Otophysi

SUBSÉRIE – Characiphysi

ORDEM – Characiformes

FAMÍLIA – Erythrinidae

GÊNERO – *Hoplias*

ESPÉCIE: *Hoplias intermedius*

Uma espécie de peixe teoricamente ideal para avaliar genotoxicidade de um tipo de substância poluente deve obedecer aos seguintes critérios: (1) deve ser difundida em diferentes ecossistemas, cosmopolita se possível, a fim de ser empregada para levantamentos *in situ*; (2) suficientemente sensível para a detecção de genotoxicidade de uma ampla gama de poluentes em baixas doses; (3) deve ser adequada para as condições de laboratório, a fim de ser possível a realização de experimentos; (4) possuir grandes populações naturais, a fim de impedir predação de indivíduos e não colocar a espécie em risco, ou impedir a sua conservação (SANCHEZ-GALAN *et al.*, 1999).

A família, que ocorre em quase todas as bacias hidrográficas das Américas Central e Sul, desde a Costa Rica até a Argentina, apresentando diferentes áreas de endemismo, é composta por três gêneros: *Erythrinus*, *Hoplerythrinus* e *Hoplias*. O trairão, *Hoplias intermedius* pertence à ordem Characiformes e à família Erythrinidae, apresentando um corpo cilíndrico e nadadeira caudal arredondada (OYAKAWA e MATTOX, 2009).

Peixes desta família caracterizam-se por possuir o corpo cilíndrico, nadadeira caudal arredondada e pela ausência de nadadeira adiposa (OYAKAWA e MATTOX, 2009). Além disso, não possuem fontanela frontal (BRITSKI, 1972) e podem atingir até um metro de comprimento e ter entre 15-20kg de peso corporal (BRITSKI, 1972). Possuem preferência por ambientes nos quais predam outros peixes por serem essencialmente carnívoros. Em muitas

regiões da América do Sul, estes peixes são importantes na pesca comercial, mas principalmente na pesca de subsistência, para populações ribeirinhas. Como características particulares da espécie podem-se enumerar: a presença de dentes caninos ou cônicos nas maxilas, ausência de nadadeira adiposa e escamas relativamente largas (OYAKAWA e MATTOX, 2009).

A espécie, *Hoplias intermedius* (FIGURA 7) é onívora durante seu primeiro ano de desenvolvimento, com uma dieta que compreende microcrustáceos, algas e insetos aquáticos. Estes indivíduos têm em sua dieta uma média de 75% de insetos e 25% de pequenos peixes (CASTRO e CASATTI, 1997). Após este período (normalmente após alcançarem, aproximadamente, 12 cm de comprimento), tornam-se estritamente carnívoras e muito especializadas em piscivoria. Os lambaris (*Astyanax* sp.) correspondem a alguns dos peixes de preferencia, porém, em situações de pouca abundância de presas, as traíras enriquecem a sua dieta com outros itens, como crustáceos, por exemplo. Estas presas alternativas tanto podem ser animais que habitam a coluna de água quanto bentônicos. Há também registros de outros gêneros de preferência, como por exemplo, *Curimata* e *Aequidens* (SOARES; ALMEIDA; TUNK, 1986). Já como os principais predadores das traíras no meio aquático, podemos citar a piranha (*Serrasalmus rhombeus*) e o caparari (*Pseudoplatystoma tigrinum*) (PLANQUETTE; KEITH; LE BAIL, 1996).

FIGURA 7 - EXEMPLAR DA ESPÉCIE *Hoplias intermedius* UTILIZADO NESTE ESTUDO.



Fonte: A autora (2014)

Esta espécie foi escolhida para os dois primeiros trabalhos desta tese por possuir uma ampla distribuição geográfica e ser piscívoro, possuindo assim uma vantagem de poder ser mantido em laboratório e ser alimentado com peixes menores, principalmente do gênero

Astyanax, os quais são devorados em sua totalidade e inteiros, facilitando assim sua exposição aos contaminantes de interesse.

Além disso, uma curiosidade relacionada ao hábito predador das traíras é perceptível no movimento de outros peixes ao longo dos rios, que em sua movimentação não são influenciados apenas devido às correntes e à temperatura, mas também devido à presença ou à ausência de predadores naquelas águas (GILLIAN e FRASER, 2001). Habitam preferencialmente ambientes lóticos, possui comportamento territorialista e hábitos noturnos. Permanecem junto à vegetação durante o dia, saindo para caçar durante a noite.

2.6 O USO DE CÉLULAS DE PEIXES NO ESTUDO DE ECOTOXICOLOGIA

Atualmente, inúmeros testes de curta-duração, utilizando uma ampla variedade de organismos-teste, vêm sendo desenvolvidos para a avaliação dos efeitos deletérios induzido por agentes químicos ambientais (VANZELLA, 2006). Para que a investigação ambiental seja eficiente, há a necessidade de uma escolha adequada do tipo de ensaio a ser utilizado, cuja escolha deve levar em consideração, entre outros fatores, a sensibilidade do sistema-teste em relação ao objetivo do estudo proposto (HOUK, 1992).

Sistemas-teste podem ser divididos em grupos determinados pelo tipo de sistema biológico utilizado. Os peixes são animais comumente utilizados como organismos-testes no contexto da toxicologia aquática, pois atuam em diversos níveis da cadeia trófica, sofrem bioacumulação, são capazes de responder à presença de mutágenos em baixas concentrações, além de ativarem o sistema enzimático do citocromo P450, um sistema de enzimas mono oxigenases com grupo heme, responsável pelo metabolismo oxidativo de compostos lipofílicos de origem endógena ou exógena, como por exemplo, poluentes ambientais (GOKSOYR *et al.*, 1991; MINISSI *et al.*, 1996).

Apesar de ser um excelente sistema-teste para avaliação da contaminação aquática, os ensaios ecotoxicológicos *in vivo* necessitam de muitas centenas de peixes para sua realização, o que tem se mostrado contraditório aos movimentos atuais da Toxicologia de implantação dos 3R (*Replacement, Reduction and Refinement of Animal Testing*). Atualmente, grandes incentivos para o desenvolvimento de modelos *in vitro*, denominados de métodos alternativos a experimentação animal, têm sido concedidos à academia e à indústria tanto internacionalmente (e.g. Comunidade Europeia e EUA) como no Brasil, sendo este último visualizado pela criação da Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) e o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM). Diversas alternativas *in*

vitro já são visualizadas para avaliação toxicológica de produtos químicos que serão inseridos no mercado para consumo humano, entretanto, poucas são as metodologias *in vitro*, existentes no âmbito da Toxicologia Aquática. Segundo Stott *et al.* (2015), atualmente há uma necessidade de desenvolver métodos alternativos para reduzir os estudos utilizando peixes para reconhecer e classificar contaminantes ambientais nocivos.

A utilização de linhagens celulares e células primárias de peixes é uma alternativa *in vitro* para avaliar a toxicidade de agentes químicos e amostras ambientais na ecotoxicologia (BARON *et al.*, 2012). Em geral, estudos *in vitro* são conduzidos com células cultivadas em monocamadas [cultivo celular bidimensional (2D)] e, apesar de muitas respostas satisfatórias, sabe-se que células cultivadas em 2D apresentam limitações evidentes como a não reprodução da arquitetura dos tecidos *in vivo*, o que muitas vezes podem não fornecer informações relevantes quanto a toxicidade órgão-específica (MAZZOLENI *et al.*, 2009). Adicionalmente, células em monocamadas (2D) apresentam também outras desvantagens, tais como a falta de interações célula-matriz extracelular (ECM – *Extracellular matrix*) e célula-célula, sendo este último devido ao fato da maioria destes sistemas serem baseados em um único tipo celular, geralmente, monoclonais em origem (GROEBER *et al.*, 2011; HARTUNG, 2011).

Para suprir esta deficiência, novas tecnologias têm sido desenvolvidas baseadas em sistemas de cultivo celular tridimensional (3D), os quais se acreditam, podem melhor reproduzir as condições *in vivo* e, assim, fornecer dados mais confiáveis quanto ao potencial citotóxico e genotóxico de agentes químicos e/ou físicos (LAN e STARLY, 2011). Dentre os diferentes tipos de cultivo celular 3D, temos os esferóides celulares, que são grandes agregados de células formadas por aglomeração de células isoladas. Tais esferóides são produzidos em superfícies antiaderentes, como cápsulas de alginato. Trabalhos empregando células de peixes (primárias e linhagens celulares) cultivadas em sistemas 2D (FARKAS *et al.*, 2010, 2011; KIENZLER *et al.*, 2012; MASSARSKY *et al.*, 2014; MUNARI *et al.*, 2014; STOTT *et al.*, 2015; THOMAS *et al.*, 2011) e como esferóides celulares (3D) (BARON *et al.*, 2012; UCHEA *et al.*, 2015) já podem ser encontrados na literatura. Contudo, estudos ainda são necessários para a elucidação das diferenças de sensibilidade das células de peixe quando cultivadas em sistemas 2D e 3D frente a resposta a diferentes contaminantes. Além disso, faz-se também necessário a validação destas alternativas *in vitro* para estudos com peixes em relação às respostas obtidas por estudos *in vivo*.

Como mencionado acima, contaminantes ambientais podem exercer diversos efeitos nocivos aos organismos expostos e a determinação da periculosidade destes poluentes requer a realização de estudos empregando organismos-teste e biomarcadores. A citotoxicidade é

caracterizada pela indução de danos celulares estruturais e/ou funcionais, que podem acarretar em distúrbios fisiológicos e no ciclo celular, resultando em morte celular (MARIN-MORALES *et al.*, 2009). Diversos ensaios biológicos *in vitro* são normalmente empregados para avaliação dos efeitos citotóxicos de contaminantes ambientais. Estes ensaios, em geral, são baseados no uso de diferentes biomarcadores relacionados às vias de morte celular (apoptose e necrose), por exemplo, avaliação da atividade mitocondrial; de alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$); da translocação dos fosfolipídios fosfatidil serina da face interna para a externa da membrana plasmática, entre outros (LEME *et al.*, 2011).

Testes de genotoxicidade estão relacionados com a detecção de agentes químicos capazes de induzirem danos no DNA dos organismos vivos e são considerados como o primeiro alerta da carcinogenicidade. O ensaio cometa é um método eficiente para a detecção de mudanças muito pequenas na estrutura do DNA, tais como as atividades de reparo, modo de seu empacotamento e sua integridade (KOPPENET *et al.*, 1999). Este teste consiste, particularmente, em uma técnica valiosa e barata, pois permite a detecção de diferentes respostas celulares ao dano e ao reparo de DNA, observadas pela migração, em eletroforese, de qualquer tipo celular obtido por uma suspensão simples (SASAKI *et al.*, 1997, MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998). Entre a grande variedade possível de lesões no DNA, as detectadas pela versão alcalina do ensaio cometa referem-se a quebras de fita simples e dupla de DNA, sítios álcali lábeis, ligação cruzada entre DNA-DNA ou DNA-proteína e quebras de fita simples associadas com reparo por excisão.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Diante da ampla distribuição e relativa abundância do gênero *Hoplias* na região Neotropical, bem como a sua importância para as populações ribeirinhas como forma de subsistência, este estudo utilizou a espécie *Hoplias intermedius* para verificar se existe a diferença entre os biomarcadores bioquímicos e genéticos avaliados após a exposição subcrônica e trófica às nanopartículas de dióxido de titânio, ao chumbo inorgânico e ao alumínio, e também às suas associações. Além disso, frente à escassez de dados de genotoxicidade de espécies nativas, esse trabalho se faz necessário na tentativa de gerar um banco de dados mais consistente acerca das respostas destas espécies frente aos contaminantes emergentes e suas misturas com contaminantes persistentes no ambiente.

Além disso, o capítulo III tem como objetivo avaliar em um modelo celular tridimensional desenvolvido em hepatócitos de peixe da espécie *Onchorynchus mykiss* (truta arco-íris) a internalização de nanopartículas de prata, bem como a resposta deste tipo celular após à exposição às nanopartículas. Esta parte do projeto foi desenvolvida na Universidade de Plymouth (UK), com a orientação do Prof Dr Awadesh Jha e supervisão do Dr. Matthew Baron, com o intuito de, no futuro, ser implantada como técnica no Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental – UFPR.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

No desenvolvimento desta tese, os capítulos seguintes foram realizados no intuito de atingir os seguintes objetivos:

- Avaliar a toxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂), do chumbo inorgânico (PbII), e de ambos os contaminantes quando em associação por meio da contaminação subcrônica (70 dias), via – trófica na espécie de peixe nativa *Hoplias intermedius* (conhecido popularmente como trairão). As concentrações de 0,1; 1; 10 µg/g foram escolhidas para as nanopartículas de TiO₂ e a concentração de 21 µg/g foi escolhida para o chumbo. Essa avaliação foi realizada após a aplicação de biomarcadores genéticos (frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares; ensaio cometa em sangue e em células da brânquia, do fígado, do rim

posterior e do cérebro; ensaio de difusão do DNA em eritrócitos e células do fígado) e bioquímicos (biomarcadores de neurotoxicidade, do sistema antioxidante e do sistema de biotransformação).

- Avaliar a bioacumulação no tecido muscular dos peixes entre os grupos (controle e expostos), realizando a quantificação do metal chumbo. Por fim, através dos resultados genéticos e bioquímicos, concluir se os compostos provocam modificações prejudiciais nos organismos estudados e se estas alterações são potencializadas ou não quando os compostos encontram-se em associação.
- Avaliar a toxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂), do alumínio (Al) e de ambos os contaminantes quando em associação através de contaminação subcrônica (70 dias), via – trófica na espécie de peixe nativa *Hoplias intermedius* (conhecido popularmente como trairão). As concentrações 0,1; 1; 10 µg/g de nanopartículas foram escolhidas para as nanopartículas de TiO₂ e a concentração de 50 µg/g foi escolhida para o alumínio. Essa avaliação foi realizada utilizando biomarcadores genéticos (frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares; ensaio cometa em sangue e em células da brânquia, do fígado, do rim posterior e do cérebro; ensaio de difusão do DNA em eritrócitos e células do fígado) e bioquímicos (biomarcadores de neurotoxicidade, do sistema antioxidante e do sistema de biotransformação).
- Avaliar a bioacumulação no tecido muscular dos peixes entre os grupos (controle e expostos), realizando a quantificação do metal alumínio. Por fim, através dos resultados genéticos e bioquímicos, concluir se os compostos provocam modificações prejudiciais nos organismos estudados e se estas modificações são potencializadas ou não quando os compostos encontram-se em associação.
- Verificar a aplicabilidade do cultivo celular 3D, confeccionado em hepatócitos (células primárias) de truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*), espécie não nativa brasileira, na avaliação da toxicidade de dois tipos diferentes de nanopartículas de prata (AgNPs): uma adquirida comercialmente (marca Sigma-Aldrich®) e outra manufaturada e estabilizada com dodecanetiol. Além disso, o uso de AgNO₃ (íons Ag⁺) também se fez necessário, na tentativa de se avaliar se o modelo em questão também seria útil na exposição à íons metálicos. Desse modo, a escolha de apenas uma concentração, de 1 mg/mL dos três tipos de prata utilizados, se fez necessário.

CAPÍTULO I

Avaliação da toxicidade subcrônica das nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) e co-exposição com o chumbo inorgânico (PbII), na espécie de peixe Neotropical *Hoplias intermedius*, utilizando biomarcadores genéticos e bioquímicos.

Autores: Taynah Vicari, Helyandra Schicora Gonçalves, Laís Fernanda Oya Silva, Tatiane Klingelfus, Camila Mattos, Letícia da Silva Pereira, Carmen Lúcia Voigt, Helena Cristina Silva de Assis, Marta Margarete Cestari.

Manuscrito em preparação

RESUMO

O uso dos nanomateriais vem aumentando rapidamente enquanto que pouco se sabe a respeito dos seus possíveis efeitos ecotoxicológicos. As nanopartículas de TiO₂ (<100nm de diâmetro) são descritas na literatura por causar estresse oxidativo, incluindo inflamação, citotoxicidade e instabilidade genômica. Tanto na coluna d'água quanto nos sedimentos, essas nanopartículas podem se misturar e interagir com outros poluentes ambientais, como os xenobióticos orgânicos e metais, levando a possíveis mudanças na toxicidade de alguns deles. Na tentativa de se avaliar se existem alterações na toxicidade das nanopartículas de TiO₂, quando co-expostas aos metais, o chumbo foi o metal escolhido. O chumbo vem sendo usado pela população humana a milhares de anos e, apesar do aumento sobre o controle de sua utilização, ainda preocupa a saúde humana e do meio ambiente, sendo classificado como poluente prioritário (USEPA, 2006). A ocorrência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares, bem como o ensaio cometa em eritrócitos e em tecidos (Fígado, rim, cérebro e brânquias), foram utilizados para avaliar a genotoxicidade destes compostos na espécie de peixe Neotropical de água doce *Hoplias intermedius*, após exposição trófica e sub crônica (70 dias). Além disso, os biomarcadores de neurotoxicidade (AChE cerebral e muscular), biomarcadores de estresse oxidativo (SOD e CAT) de biotransformação (GST e EROD) e danos em macromoléculas, bem como a concentração de metalotioneínas foram mensurados na tentativa de se avaliar a proteção do peixe em questão, contra a exposição às nanopartículas, ao metal Pb e à co-exposição destes contaminantes. O teste do micronúcleo pisco e alterações morfológicas nucleares apresentou uma diminuição do número de alterações totais apenas para o grupo exposto ao Pb+1 NP. Além disso esse mesmo grupo apresentou uma redução de danos ao material genético, para o ensaio cometa em eritrócitos, quando comparados aos grupos expostos aos contaminantes de forma isolada. Na avaliação das alterações isoladas, bem como o número de micronúcleos, estas análises mostraram o metal chumbo como indutor de micronúcleos, bem como alterações do tipo *lobed* e *notched*. As alterações do tipo *lobed* e *notched* também se mostraram significativas para os grupos expostos apenas às nanopartículas de TiO₂ e aos grupos de co-exposição aos contaminantes. O ensaio cometa em eritrócitos, brânquias, rim e cérebro, mostraram respostas similares para os grupos de exposição às três diferentes concentrações de nanopartículas. O ensaio cometa do sangue mostrou ainda, para o grupo de exposição ao Pb+ 0,1 NP, um aumento dos danos em relação ao controle negativo. O ensaio cometa de brânquias, rim e cérebro, mostrou a maioria dos seus resultados com efeitos concordantes em relação a todos os conjuntos de análise estatística. A maioria das respostas enzimáticas não foi induzida pela exposição ao chumbo, com exceção das metalotioneínas. Em relação à exposição às nanopartículas, a maioria das enzimas também não sofreu alterações, com exceção da AChE cerebral e muscular. Em relação aos grupos de co-exposição aos contaminantes, além de ambas acetilcolinesterases, a SOD e a CAT também apresentaram alterações. O efeito de interação destes contaminantes foi identificado apenas em alguns ensaios, possivelmente devido à dificuldade em se avaliar os efeitos das misturas dos contaminantes.

Palavras chave: nanomateriais, ensaio trófico, estresse oxidativo, genotoxicidade tecido-específica.

INTRODUÇÃO

O ambiente aquático é o destino final dos poluentes produzidos por fontes naturais e/ou antropogênicas e o acúmulo e persistência dessas substâncias neste ambiente constitui uma ameaça para a vida (FLEEGER *et al.*, 2003). Nanomateriais manufaturados são as mais recentes substâncias a serem destinadas ao ambiente aquático. Estes materiais, que por definição possuem pelo menos uma de suas dimensões entre 1 e 100 nm (EPA, 2007; Klaine *et al.*, 2008) e compreendem as nanopartículas, os nanotubos, os *nanowires*, os fulerenos e derivados, são especialmente projetados para aplicações industriais bem definidas e são os pilares da Nanotecnologia. Recentemente, o avanço da nanotecnologia e o aumento do uso desses nanomateriais manufaturados em produtos comercializados aumentou a preocupação com relação aos possíveis efeitos à saúde humana e dos ecossistemas (COLVIN, 2003; EPA, 2007; HANDY *et al.*, 2008a).

Um dos tipos de nanopartículas mais utilizados são as nanopartículas de dióxido de titânio. Devido à sua produção estar na casa de toneladas ao ano e sua crescente aplicação industrial, essas nanopartículas de TiO₂ são lançadas nos esgotos urbanos e industriais e acabam atingindo os corpos d'água (MENARD *et al.*, 2011; GONDIKAS *et al.*, 2014). Os estudos publicados sugerem que, em diferentes sistemas biológicos, interações de nanopartículas com outros fatores químico e/ ou físicos podem resultar em um aumento da toxicidade ou de efeitos adversos, aumento ainda mais a preocupação relacionada à saúde de seres humanos e do meio ambiente (LIU *et al.*, 2013).

A maioria dos estudos relacionados aos efeitos à saúde humana e dos ecossistemas possuem um foco nos efeitos biológicos e na toxicidade dessas nanopartículas. Entretanto, sabe-se muito pouco a respeito do destino delas no meio ambiente, o potencial de bioacumulação e principalmente, sobre a capacidade de transferência ao longo da cadeia alimentar (KLAINÉ *et al.*, 2008; HANDY *et al.*, 2008b). Avaliações de risco ambiental confiáveis destes nanomateriais devem levar em consideração informações não apenas sobre a concentração dos mesmos e a toxicidade esperada na biota, mas também acerca da bioconcentração, da bioacumulação e da biomagnificação, nas cadeias alimentares aquáticas (ZHU *et al.*, 2010). Tanto na coluna d'água, quanto nos sedimentos, as nanopartículas podem interagir com outros componentes, não apenas com a matéria orgânica particulada, mas também com contaminantes orgânicos hidrofóbicos e íons inorgânicos, incluindo os íons metálicos (MAURER-JONES *et al.*, 2013; BAKER *et al.*, 2014; CORSI *et al.*, 2014; GRILLO *et al.*, 2014).

Limbach *et al.* (2007) foi um dos primeiros estudos a postular sobre o que chamou de efeito “cavalo de Tróia” (do inglês *Trojan horse effect*), que seria a entrada facilitada nas células de moléculas tóxicas que estariam adsorvidas às nanopartículas. Baun *et al.* (2008) estendeu esse conceito a um contexto ambiental, recomendando que a avaliação de risco das nanopartículas deveria considerar não apenas a sua toxicidade inerente, mas também considerar possíveis interações com contaminantes que já estariam no ambiente, e que podem levar a mudanças na biodisponibilidade, na bioconcentração e na toxicidade.

Deste modo, a fim de se avaliar os efeitos da capacidade de interação das nanopartículas de dióxido de titânio à outros metais, o chumbo (Pb II), foi o metal escolhido para a realização deste trabalho. O metal chumbo mantém seu status de contaminante prioritário segundo a USEPA (2006), devido principalmente à sua alta persistência no meio ambiente. Nos últimos anos, ocorreu um aumento expressivo sobre o controle do uso do chumbo, que ainda hoje é muito empregado em indústrias, na fabricação de baterias, tintas, refino, na reparação de automóveis, soldas e na composição de rodenticidas, sendo levado ao ambiente aquático por efluentes industriais, pela deposição de partículas atmosféricas ou por sedimentos que funcionam como reservatórios abundantes de chumbo (Johnson, 1998). O chumbo é um metal não essencial e possui a capacidade de mimetizar elementos essenciais no organismo, principalmente cálcio, ferro e zinco, ligando-se às mesmas proteínas e moléculas que estes metais, causando alterações nas atividades fisiológicas normais da célula. Este metal é considerado neurotóxico e nefrotóxico, além de causar efeitos deletérios no sistema cardiovascular e hematológico (ATSDR, 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar utilizando biomarcadores bioquímicos e genéticos, os efeitos das nanopartículas de dióxido de titânio e do chumbo, quando estes contaminantes se encontram sozinhos e quando utilizados em associação, a fim de se verificar se existem efeitos relacionados ao uso concomitante desses contaminantes. Os efeitos biológicos das misturas de contaminantes são difíceis de prever (CANESI, CIACCI, BALBI, 2015), e ainda mais desafiadores quando um desses contaminantes é uma nanopartícula, devido às propriedades particulares destas substâncias e seu comportamento imprevisível em condições similares às ambientais. Para evitar um novo desastre ambiental, não muito diferente do que foi visto com o DDT e com as bifenilas policloradas (PCBs) em organismos de vários níveis tróficos, o potencial de transferência das nanopartículas e de outros compostos que possam estar a ela adsorvidos e as consequências ecológicas associadas a essas nanopartículas, devem ser investigadas. Desse modo, a utilização de uma exposição trófica é de fundamental importância para a geração de informações a respeito das nanopartículas, principalmente em

peixes Neotropicais, para os quais o banco de dados é ainda mais escasso. Este tipo de abordagem experimental tem por principal motivo imitar uma condição encontrada em ecossistemas naturais de água doce, aumentando o nosso conhecimento sobre essa espécie Neotropical e a toxicidade das nanopartículas de TiO₂ e do chumbo, já tinha sido utilizada, com sucesso, em outros estudos (FERRARO *et al.*, 2004; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2006; MELA *et al.*, 2007; VICARI *et al.*, 2012)

MATERIAL E MÉTODOS

Organismo teste

A família, que ocorre em quase todas as bacias hidrográficas das Américas Central e Sul, desde a Costa Rica até a Argentina, é composta por três gêneros: *Erythrinus*, *Hoplerethrinus* e *Hoplias*. A espécie *Hoplias intermedius* (popularmente conhecido como trairão) (Characiformes, ERYTHRINIDAE), endêmica da América do Sul, foi escolhida como organismo teste para a realização deste estudo. Peixes desta família caracterizam-se por possuir o corpo cilíndrico, nadadeira caudal arredondada e pela ausência de nadadeira adiposa (OYAKAWA e MATTOX, 2009). Podem atingir até um metro de comprimento e ter entre 15-20 kg de peso corporal (BRITSKI, 1972). Estes peixes possuem preferência por ambientes lóticos (OYAKAWA e MATTOX, 2009), ambientes nos quais predam outros peixes por serem essencialmente carnívoros. Em muitas regiões da América do Sul, estes peixes são importantes na pesca comercial, mas principalmente na pesca de subsistência.

Os exemplares foram obtidos da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de FURNAS, São José do Rio da Barra, sul do estado de Minas Gerais - Brasil. A piscicultura não apresenta contaminação ou fontes capazes de fazê-lo. Os peixes foram aclimatados durante aproximadamente 40 dias em tanques de 250 litros com aeração, fotoperíodo controlado (12h claro/ 12h escuro) e alimentação diária. Este gênero tem a vantagem de ser facilmente alimentado em condições de laboratoriais e em bioensaios, porque ele devora a sua presa inteira, facilitando assim a contaminação com qualquer contaminante de interesse, por via trófica (FERRARO *et al.*, 2004). Depois de decorridos os 40 dias de aclimação, os peixes foram distribuídos em uma densidade populacional de um peixe em cada aquário de 20 litros contendo água de - clorada, mantidos a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com o pH 7.2, aeração constante e foto período de 12h claro/ 12h escuro e a partir deste período, os peixes passaram a ser alimentados a cada 5 dias, com um exemplar de *Astyanax* sp.

Preparo de soluções e suspensões

As nanopartículas de dióxido de titânio (marca Sigma-Aldrich® - Titanium (IV) oxide nanopowder, 21 nm particle size (TEM), $\geq 99.5\%$ trace metal basis) foram adquiridas na forma de pó de coloração branca. As três suspensões de nanopartículas de TiO_2 foram confeccionadas do mesmo modo (adicionando-se o pó em água ultrapura) nas concentrações de 0.01 mg/L; 0.1 mg/L e 1 mg/L. As suspensões foram então sonicadas por 6 horas em banho-maria ultrassônico (marca Schuster®, modelo: L-100), com uma frequência de 42 khz e, antes de serem utilizadas nos ciclos de contaminação, foram novamente sonicadas por 30 minutos cada uma, utilizando a sonda sonicadora (marca: Sonics®; modelo: VCX130PB), em uma frequência de 20 khz e amplitude de 80%.

As concentrações das suspensões de nanopartículas foram escolhidas baseadas no artigo de ZHU *et al.* (2010). Neste trabalho, os autores recriam em um bioensaio, utilizando condições de exposição trófica entre a espécie *Daphnia magna* e o peixe zebra (*Danio rerio*), expondo as daphnias a concentrações de 0.1 mg/L e 1 mg/L. Devido à falta de informações relacionadas a este tipo de exposição, decidimos ainda utilizar um terceiro valor, 10 vezes abaixo do menor valor, finalizando os experimentos com 3 suspensões de nanopartículas de dióxido de titânio, nas concentrações de 0.01 mg/L; 0.1 mg/L; 1 mg/L.

Para o processo de caracterização das nanopartículas foram utilizadas as imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), bem como a difração de raios-X para confirmar a estrutura cristalina do nanomaterial fornecida pelo vendedor. Para os cálculos da área de superfície específica, o porosímetro Quantachrome® foi utilizado e através do método descrito por Brunauer Emmett Teller (Teoria da Adsorção Multimolecular – método B.E.T.), foi realizada, adicionalmente, a análise da porosidade da superfície das nanopartículas. A técnica de XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy) foi também utilizada para uma análise mais detalhada da estrutura química de superfície das nanopartículas.

A caracterização da suspensão de nanopartícula foi realizada através do aparelho Zetasizer® Nano Series ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) no qual se verificou o tamanho médio das partículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta das mesmas. As medidas foram realizadas a 25 °C. Para análise de tamanho das partículas e índice de polidispersão utilizou-se cubeta de poliestireno. Cada análise durou em média 105 s e foi obtida com um ângulo de detecção de 90° e laser vermelho 633 nm. Para determinar o potencial zeta, as amostras foram colocadas em célula eletroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido, realizando em média 12 corridas para cada amostra. Através do índice de polidispersão foi possível calcular a porcentagem (%) de polidispersão [%

Polidispersão (%Pd) = $(\text{PdI})^{1/2} \times 100$], para verificar a homogeneidade de tamanhos de partículas presentes na suspensão coloidal, sendo considerada como suspensão homogênea quando %Pd < 20 (Malvern, 2005).

O chumbo, na sua forma $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, (CAS number: 10099-74-8) foi utilizado na concentração de 21 µg de PbII/ g de peixe. Este valor foi escolhido, pois dois trabalhos já foram publicados com a espécie do mesmo gênero (*Hoplias malabaricus*) ao qual a espécie deste estudo pertence, com resultados satisfatórios, porém um foi realizado via trófica e o outro através de injeção intraperitoneal (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2006; RAMSDORF *et al.*, 2009).

Desenho experimental

Decorrido o período de aclimação, o bioensaio terá início. Os trairões serão expostos aos xenobiontes por via alimentar – exposição trófica. As presas são exemplares do gênero *Astyanax* sp., que serão previamente contaminados com uma injeção intraperitoneal com os contaminantes ou água destilada no caso do controle negativo. No total temos 5 grupos de exposição: um grupo que foi contaminado apenas com as nanopartículas de dióxido de titânio, outro grupo que foi contaminado apenas com o nitrato de chumbo, e um terceiro grupo, cuja presa receberá duas injeções, sequenciais, de nanopartícula de dióxido de titânio e de chumbo. O quarto grupo é o grupo controle negativo e, neste caso, a presa recebeu uma injeção de água destilada. O quinto grupo é o grupo controle positivo, porém neste grupo foi injetado no trairão (*Hoplias intermedius*), 5 µg de MMS/g do peso do animal, apenas 24 horas antes do término do experimento, de forma que todos os grupos de exposição foram mantidos sob as mesmas condições de aeração e fotoperíodo, durante 70 dias de experimento e 14 ciclos de alimentação. Após as injeções, as presas eram destinadas aos seus respectivos aquários. Cada peixe é considerado como exposto ao contaminante após ingerir a presa por completo.

O volume da solução de metal injetado em cada presa, bem como o volume injetado das suspensões de nanopartículas de dióxido de titânio e de água destilada foi ajustado de acordo com os pesos individuais de cada um dos peixes que receberiam as presas, para alcançar as doses de: 21 µg de PbII / g do peso do animal; 0.1 µg/g, 1 µg/g e 10 µg/g do peso do animal. Após 70 dias do início da contaminação, contendo 14 ciclos de alimentação, a cada 96 horas, deu-se início à coleta das amostras.

Para a obtenção das amostras, os exemplares de *H. intermedius* foram anestesiados com benzocaína (Merck®, Darmstadt, Germany) diluída em etanol a 10%, em uma

concentração de 10 mg/L, e em seguida, sacrificados através de secção medular, e posteriormente pesados, medidos e sexados (CABRAL GONTIJO *et al.*, 2003).

Com o auxílio de uma seringa e agulha heparinizada, o sangue periférico foi extraído através da veia caudal, em seguida foi confeccionada uma lâmina de esfregaço sanguíneo para o Teste de Micronúcleo Písceo e o restante da amostra de sangue foi coletado em microtubos do tipo Eppendorf[®], contendo 1,0 mL de soro bovino fetal e armazenados sob-refrigeração e na ausência de luz. Imediatamente após serem sacrificados por uma secção medular, com o auxílio de tesoura e pinças, foram retiradas amostras dos tecidos branquial, hepático, renal e cerebral e em seguida, colocadas em microtubos do tipo Eppendorf[®], contendo 500 µL de soro bovino fetal e guardados sob-refrigeração para posterior realização do Ensaio Cometa. Procedeu-se também a retirada dos órgãos de interesse (fígado, cérebro e músculo) para a confecção das análises bioquímicas. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer - 80°C até a preparação das amostras.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioensaios pertencente ao Laboratório de Mutagênese Ambiental do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. O experimento realizado foi aprovado pela Comissão de ética para Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), sob o certificado de número 791.

Concentração do metal no tecido muscular.

Para a análise de bioconcentração do chumbo (Pb) *pools* de músculo (0,5 g) de todos os peixes expostos ao chumbo, chumbo associado às nanopartículas, bem como do grupo controle negativo, foram digeridos em ácido nítrico (65%) e peróxido de hidrogênio (30%), sob aquecimento (90-95° C, por aproximadamente 30 minutos), para aceleração do processo de digestão. A concentração de Pb foi aferida nas amostras digeridas por espectrofotometria de emissão ótica por plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP-OES), pelo Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (CEPPA-UFPR).

Biomarcadores bioquímicos

Preparo das amostras

Assim que foram retiradas do congelamento, as amostras foram preparadas como a seguir:

Um fragmento de cérebro (± 50 mg) e do músculo axial (± 100 mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,5), numa proporção 1:10 (peso: volume). Em seguida o homogenato foi centrifugado a 12.000 xg por 20 minutos à 4°C. O sobrenadante foi aliqotado para a análise da atividade da enzima acetilcolinesterase no músculo e no cérebro, respectivamente.

Uma porção (± 100 mg) de cada amostra de fígado foi homogeneizada em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7), numa proporção de 1:10 (peso:volume) e centrifugadas à 15.000 xg por 30 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi aliqotado para a análise das atividades das enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e do nível de peroxidação lipídica (LPO).

Outra porção (± 80 mg) de cada amostra de fígado foi homogeneizada em tampão Tris-HCl/ Sacarose (20 mM/ 500 mM, pH 8,6), numa proporção de 1:5 (peso:volume), centrifugada a 15.000 xg por 30 minutos à 4°C, e o sobrenadante foi aliqotado para a quantificação de metalotioneínas.

Atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE, tanto cerebral quanto muscular, foi medida segundo método de Ellman *et al.* (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998), e consiste no desenvolvimento de uma reação colorimétrica entre o ATC (iodeto de acetiltiocolina) e o DTNB (5,5-Ditio-bis-2-nitro-benzoato) na presença de acetilcolinesterase, que pode ser mensurada por espectrofotometria a 405 nm. Para tanto as amostras foram diluídas para 800 µg de proteína.mL⁻¹ em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,5). Em microplaca, foram pipetados 50 µL de amostra, 200 µL de DTNB (0,75 mM) e 50 µL de ATC (9 mM), respectivamente. A leitura da atividade foi feita por 3 minutos em intervalos de 15 segundos, e a mesma foi expressa em nmol. min⁻¹ .mg de proteína⁻¹ .

Atividade das Glutathione S transferases (GSTs)

A atividade da GST foi medida segundo o método descrito por Keen, Habig e Jakoby (1976), baseado na catalisação da reação de conjugação do CDNB (1-cloro- 2,4-

dinitrobenzeno) com a glutationa reduzida (GSH), pela GST, formando um tio éter, que pode ser medido pelo aumento da absorbância a 340 nm. Os sobrenadantes de fígado foram diluídos para 2 mg de proteína.mL⁻¹. Em microplaca foram adicionados 20 µL de amostra, seguido de 180 µL de solução reação [GSH (3 mM), CDNB (3 mM), tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 6,5)]. A medida da absorbância foi feita a cada 15 segundos, durante 3 minutos, e a atividade foi expressa em nmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

Etoxiresorufina O-deetilase (EROD)

A análise da EROD foi realizada segundo o método descrito por Burke e Mayer (1974), a partir da determinação por espectrofluorimetria, a 530 nm de excitação e 590 nm de emissão, da resorufina resultante da metabolização da 7-etoxiresorufina pela EROD. Em microplaca, de fundo e paredes pretas, foram adicionados: a amostra, uma solução de 7-etoxiresorufina (2,6 µM), e a microplaca permaneceu incubada por 5 minutos, em seguida foi adicionada a solução contendo o cofator NADPH (2,6 mM). Imediatamente a fluorescência foi mensurada, a cada 1 minuto, por 10 minutos. A atividade foi expressa em fmol de resorufina. min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Para a análise da atividade da SOD no fígado, foi utilizado o método proposto por Gao *et al.* (1998), que se baseia na capacidade da SOD em inibir a autooxidação do pirogalol. O sobrenadante foi diluído de 1:10 (ou 10% V/V) em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0). Em microtubos do tipo Eppendorf[®], foram adicionados 885 µL de tampão Tris/EDTA (1 M/ 5 mM, pH 8,0) e 50 µL de pirogalol (15 mM) em 40 µL de amostra. A solução foi incubada posteriormente por 30 minutos. A reação foi interrompida com 25 µL de HCl 1N. Em microplaca foram adicionados 300 µL por poço e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 440 nm. Ao mesmo tempo, foi realizado um controle por amostra com adição dos reagentes, mas sem incubação, sendo este valor igual a 100%. A quantidade de SOD que inibi a reação de auto-oxidação do pirogalol em 50% (IC 50) equivale a 1 unidade (U) de SOD. A atividade foi expressa em U de SOD. mg de proteína⁻¹.

Atividade da Catalase (CAT)

Para medir a atividade da CAT hepática foi utilizado o método de Aebi (1984), que se baseia no consumo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) exógeno pela CAT, gerando água e oxigênio, podendo ser mensurado por espectrofotometria a 240 nm. As amostras foram

diluídas (1:5) e como substrato foi utilizado uma solução de H_2O_2 (20 mM). Em microplaca foram adicionados 5 μL da amostra e 295 μL da solução de peróxido de hidrogênio. A leitura da absorbância foi realizada a cada 15 segundos durante 1 minuto e a atividade foi expressa em $\mu\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

Nível de Lipoperoxidação (LPO)

A análise da LPO foi feita através da avaliação da concentração de hidroperóxidos pelo ensaio FOX (JIANG *et al.*, 1992), com leitura em espectrofotômetro, em 570 nm. O método consiste na oxidação do ferro, mediada pela presença de peróxidos em meio ácido. Para tanto, os sobrenadantes foram diluídos em metanol (1:2 v/v) e centrifugados. Então, 100 μL do sobrenadante foram incubados por 30 minutos com 900 μL da solução reação contendo laranja de xilenol (0,1 mM), BHT (4 mM), sulfato ferroso amoniacal (2,5 mM) e ácido sulfúrico (25 mM), diluídos em metanol. A unidade de concentração de peróxidos lipídicos usada foi $\text{nmol. mg de proteína}^{-1}$.

Metalotioneínas (MT)

Para a avaliação do conteúdo de metalotioneínas foi utilizado o método proposto por Viarengo *et al.* (1997), com algumas modificações. Este método determina o conteúdo de sulfidrilas (presentes nas MTs) a partir da comparação com uma curva de GSH, através da determinação da absorbância a 412 nm, considerando 30% como a porcentagem de cisteínas que correspondem à metalotioneínas. Para tanto foi realizada uma série de precipitações, centrifugações e ressuspensões, culminado na ressuspensão do pellet contendo metalotioneínas, ao qual foi adicionada a solução de *Ellman*, contendo: DTNB (0,4 mM) em tampão fosfato de sódio/ NaCl (0,2 M/ 2 M, pH 8). A unidade de concentração de metalotioneínas usada foi $\mu\text{g MT. mg de proteína}^{-1}$.

Concentração proteica

A concentração de proteínas totais foi mensurada, em espectrofotômetro a 595 nm, pelo método de Bradford (1976), usando BSA (soro de albumina bovina) como padrão.

Biomarcadores genéticos

Teste do Micronúcleo Písceo e alterações morfológicas nucleares

Para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade foi empregado o Teste de Micronúcleo Písceo aplicando a metodologia descrita por Vicari *et al.*, 2009. Após a coleta do sangue do animal, uma gota de sangue é colocada em uma lâmina limpa e com o auxílio de uma lamínula foi realizada a técnica do esfregaço sanguíneo. Após um período de secagem *overnight*, as lâminas foram fixadas etanol absoluto por 25 minutos. Posteriormente as lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 6,8) por 15 minutos; lavadas em água corrente e após novo período de secagem *overnight*, foram analisadas em microscópio óptico (aumento de 1000x – Olympus CX 40). Através de análise cega, foram analisadas 2000 células por lâmina observando à presença de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares.

Para as análises foram consideradas apenas hemácias nucleadas e com membrana nuclear e citoplasmática intactas. Os critérios para a identificação de eritrócitos micronucleados foram:

- a) O micronúcleo não pode ultrapassar um terço do tamanho do núcleo principal.
- b) O micronúcleo deve estar claramente separado do núcleo e ter a mesma refringência do núcleo principal.

As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadraram no conceito de micronúcleo, também foram analisadas, sendo descritas como alterações morfológicas nucleares, como descritas por Carrasco *et al* (1990) e como citado por Ayllon e Garcia-Vazquez (2001).

Ensaio Cometa

A técnica utilizada para o ensaio cometa foi a descrita por Singh *et al.* (1988) com modificações segundo Ferraro *et al.* (2004), para a confecção de lâminas com eritrócitos e segundo Ramsdorf *et al.* (2009), para os tecidos renal, hepático, branquial e cerebral.

Ensaio cometa em eritrócitos

Para montagem e análise das lâminas foram coletados 10 µL de sangue de cada animal e diluído em 1,5 mL de soro bovino fetal. Desta solução, foram coletados 10 µL de suspensão celular e misturado com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP - 0.5% - Gibco®),

levemente aquecida. A suspensão celular foi então colocada sobre uma lâmina com a cobertura de agarose normal (NMP - 0.75% - Gibco®) previamente confeccionada, e posteriormente, coberta com uma lamínula e levada a geladeira por 15 minutos. Decorrido o tempo de refrigeração, as lamínulas foram retiradas e colocadas em solução de lise a 4 °C, na qual foram mantidas por 24 horas.

A corrida eletroforética foi realizada a 4 °C no escuro, com a adição de um tampão alcalino (pH >13), de maneira a cobrir as lâminas que foram mantidas horizontalmente na solução por 30 minutos para permitir a desespiralização do DNA. A corrida foi realizada a 25 V e 300 mA, por 25 minutos. Após o término da eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em três lavagens com 5 mL de tampão de neutralização (0.4 M Tris, pH 7.5) cada uma, com 5 minutos cada sessão. As lâminas foram então secas, fixadas com etanol absoluto por 5 minutos e posteriormente analisadas.

Para a análise, cada lâmina foi corada com 20 µL de brometo de etídio (20 mg/L-Sigma-Aldrich®) e analisada imediatamente em microscópio de epifluorescência (aumento de 400 x - marca Leica® - modelo DFC 300).

Ensaio cometa em tecidos

O procedimento para montagem das lâminas iniciou após a retirada dos tecidos (brânquia, fígado, rim e cérebro) de cada exemplar, sendo acondicionados em microtubos do tipo Eppendorf® contendo 500 µL de soro bovino fetal e armazenados sob-refrigeração e ausência de luz. Os tecidos foram desagregados em micro homogeneizador (Tecnal®, modelo TE-103) a 1500 rpm por cerca de 30 segundos. Posteriormente, foram coletados 20 µL do homogenato obtido e este foi misturado com 120 µL de agarose LMP, levemente aquecida (37°C), para a montagem das lâminas. O restante do procedimento prossegue-se de forma semelhante ao ensaio cometa com eritrócitos.

Foram analisados 100 nucleóides para cada lâmina, de cada peixe. Os danos foram categorizados visualmente, segundo (COLLINS *et. al.*, 1997), levando-se em consideração a relação do comprimento da cauda em relação à ‘cabeça’ do cometa, sendo considerado: dano 0 (sem danos aparentes), dano 1 (pouco dano), dano 2 (dano moderado), dano 3 (dano elevado) e dano 4 (dano máximo). Os cometas em que não foi possível visualizar a região da cabeça foram desconsiderados da contagem por representarem material genético totalmente fragmentado, característico de células inviáveis. Os escores foram atribuídos através da multiplicação do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo número da classe.

Ensaio de difusão do DNA

O ensaio de difusão do DNA avaliou a frequência de células apoptóticas e necróticas segundo método descrito por Singh (2000) baseado no mesmo protocolo descrito acima para o ensaio cometa, com a omissão da etapa da eletroforese. Foram contabilizados 100 nucleóides e separados em células normais, em processo de apoptose em processo de necrose.

Análise estatística

Na análise estatística os tratamentos foram separados em seis grupos: **(a)** Controle, Pb e controle positivo, quando houver; **(b)** Controle, 0,1 NP, 1 NP, 10NP e controle positivo, quando houver; **(c)** Controle, Pb+0,1 NP, Pb+1 NP, Pb+ 10NP e controle positivo, quando houver; **(d)** Pb, Pb+0,1 NP, 0,1 NP e controle positivo, quando houver; **(e)** Pb, Pb+1 NP, 1 NP e controle positivo; **(f)** Pb, Pb+10 NP, 10 NP e controle positivo. Esta separação evita a análise de grupos que não possuem relevância biológica de forma conjunta, evitando assim erros estatísticos.

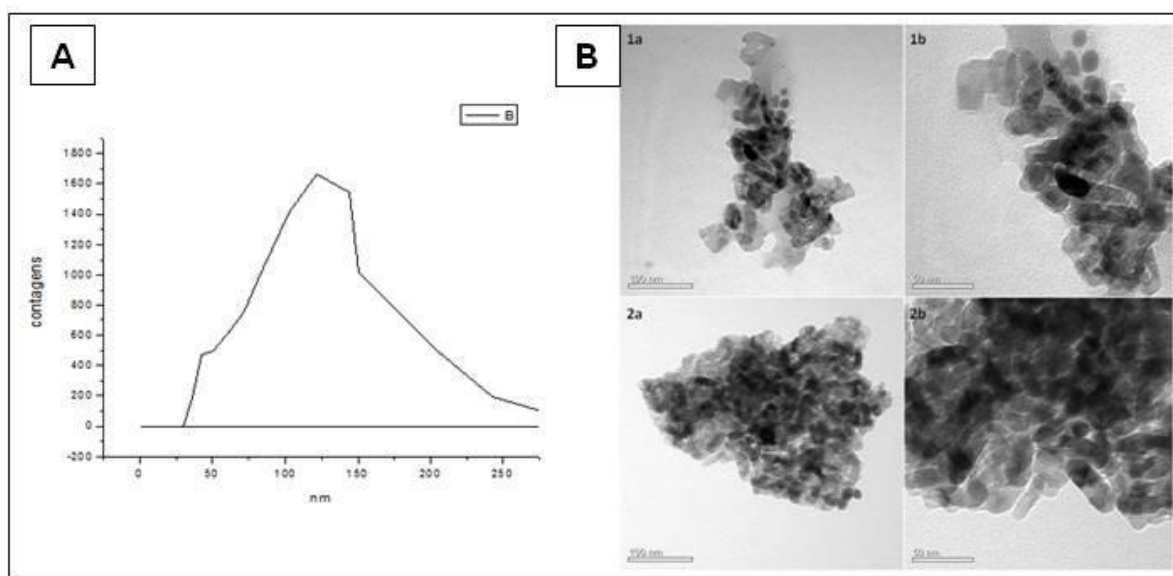
Em todos os grupos foi analisada a normalidade dos dados através do teste de Kolmogorov-Smirnov, para determinar a utilização de teste paramétrico ou não paramétrico. Caso os dados possuíssem uma distribuição normal, foi utilizado o teste ANOVA (1 critério) seguido do pós-teste T (LSD). Caso os dados não possuíssem uma distribuição normal ou apresentassem variâncias desiguais, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, com pós teste de Student-Newman-Keuls, a fim de verificar as possíveis diferenças entre os grupos expostos e grupos controle positivo e negativo, com um nível de significância menor que 0,05 ($p < 0,05$). Para tais análises e gráficos, foram utilizados os programas GraphPad® Prism e BioEstat.

RESULTADOS

Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio

As estruturas cristalinas que compunham as nanopartículas de TiO_2 eram 100% do tipo anatase, constituídas de 28,42% de titânio e 71,58% de oxigênio e apresentando uma dimensão média de 45 nm e 107 nm para as partículas agregadas. A análise pelo método B.E.T. mostrou uma área de superfície específica das nanopartículas de $83.47 \text{ m}^2/\text{g}$. Utilizando-se da microscopia eletrônica de transmissão foi obtida a estrutura morfológica das nanopartículas de dióxido de titânio em pó (FIGURA 8).

FIGURA 8 - CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE DIÓXIDO DE TITÂNIO. (A) GRÁFICO COM INFORMAÇÕES SOBRE O TAMANHO MÉDIO DAS NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ EM PÓ. (B) ELETROMICROGRAFIAS DAS NANOPARTÍCULAS DE TiO₂: “1A” E “2A” EM ESCALA DE 100 nm E EM “1B” E “2B” EM ESCALA DE



Fonte: A autora (2014)

A caracterização das três diferentes concentrações de nanopartículas de TiO₂ foi realizada através do aparelho Zeta Sizer[®]. As mensurações realizadas pelo aparelho demonstraram que as suspensões apresentaram características físico-químicas diferentes uma da outra (TABELA 2). A suspensão de concentração 0,01 mg/mL apresentou partículas de tamanho entre 150 nm e 350 nm, com o tamanho médio sendo de 234.40 nm, tamanho este que concentra o maior número de partículas (FIGURA 9). O valor do potencial zeta calculado para esta suspensão é de -15.5 mV e por este motivo é considerada uma suspensão instável. Esta instabilidade provavelmente está relacionada à força entre as partículas, que promoveu uma agregação entre elas. Ao analisarmos o valor calculado para a porcentagem de polidispersão, podemos avaliar que esta suspensão é considerada heterogênea, pois o valor calculado mostra a porcentagem como sendo maior do que 20%, valor crítico para as suspensões de nanopartículas.

Já para a suspensão de 0,1 mg/mL apresentou um tamanho de partículas ainda maior, entre 250 nm e 700 nm, com o tamanho médio das partículas sendo 425.8 nm (FIGURA 9). O valor do potencial zeta calculado para esta suspensão foi de +14.1 mV e por este valor, esta suspensão também é considerada instável. Com relação à porcentagem de polidispersão, o

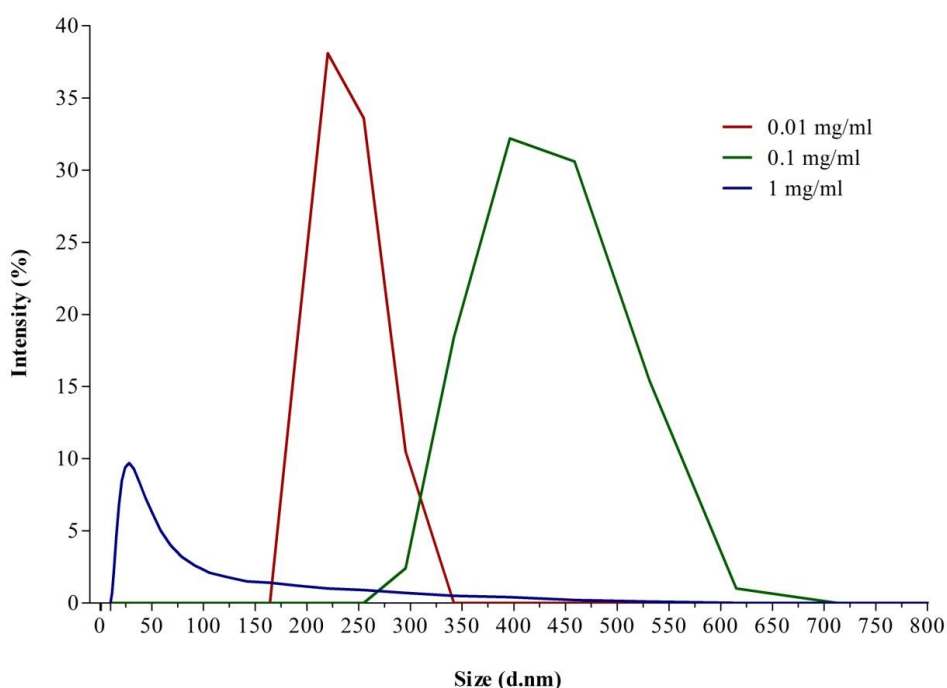
valor calculado para esta suspensão é de 64.96% (TABELA 2) e, por este motivo é considerada uma suspensão heterogênea.

Para a terceira suspensão de concentração 1 mg/mL, os resultados encontrados foram surpreendentes. Esta suspensão foi que apresentou o menor tamanho de partículas entre as três suspensões: entre 11 nm e 531 nm, com a maioria das partículas de tamanho médio de 54.87 nm (FIGURA 9). O valor do potencial zeta calculado para esta suspensão foi de +77.4 mV, sendo esta a única suspensão estável utilizada neste experimento. Com relação à porcentagem de polidispersão, esta suspensão também foi considerada heterogênea, pois o valor calculado foi de 49.70%, estando acima dos 20% críticos para as suspensões de nanopartículas (TABELA 2).

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS AVALIADAS PELO APARELHO ZETA SIZER®, DAS TRÊS SUSPENSÕES COLOIDAIS DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,01 mg/mL; 0,1 mg/mL e 1 mg/mL.

Concentração (mg/mL)	Tamanho (d.nm/intensidade)	Potencial Zeta (mV)	% de Polidispersão
0.01	234.4	-15.5 mV	86.66
0.1	425.8	14.1 mV	64.96
1	54.87	77.4 mV	49.70

FIGURA 9 - GRÁFICO QUE MOSTRA OS PICOS DE INTENSIDADE RELATIVOS AO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS, CAPTURADOS PELO APARELHO ZETA SIZER®.



Bioensaios

Concentração de metal chumbo nos tecidos

No músculo da espécie *Hoplias intermedius* não foi detectada uma quantidade significativa de chumbo, indicando que não ocorreu uma bioconcentração do metal neste tecido (TABELA 3).

TABELA 3 - QUANTIFICAÇÃO DE CHUMBO NO TECIDO MUSCULAR DE *Hoplias intermedius*, NO GRUPO CONTROLE, BEM COMO NOS GRUPOS EXPOSTOS AO CHUMBO (21 µg/g) E À ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Pb+0.1 NP), 1 µg/g (Pb+1 NP), 10 µg/g (Pb+10 NP). LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

	Tratamentos				
	(Concentração das NpTiO ₂ em µg/g)				
	Controle	Pb	Pb+0.1NP	Pb+1 NP	Pb+10NP
Músculo	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10

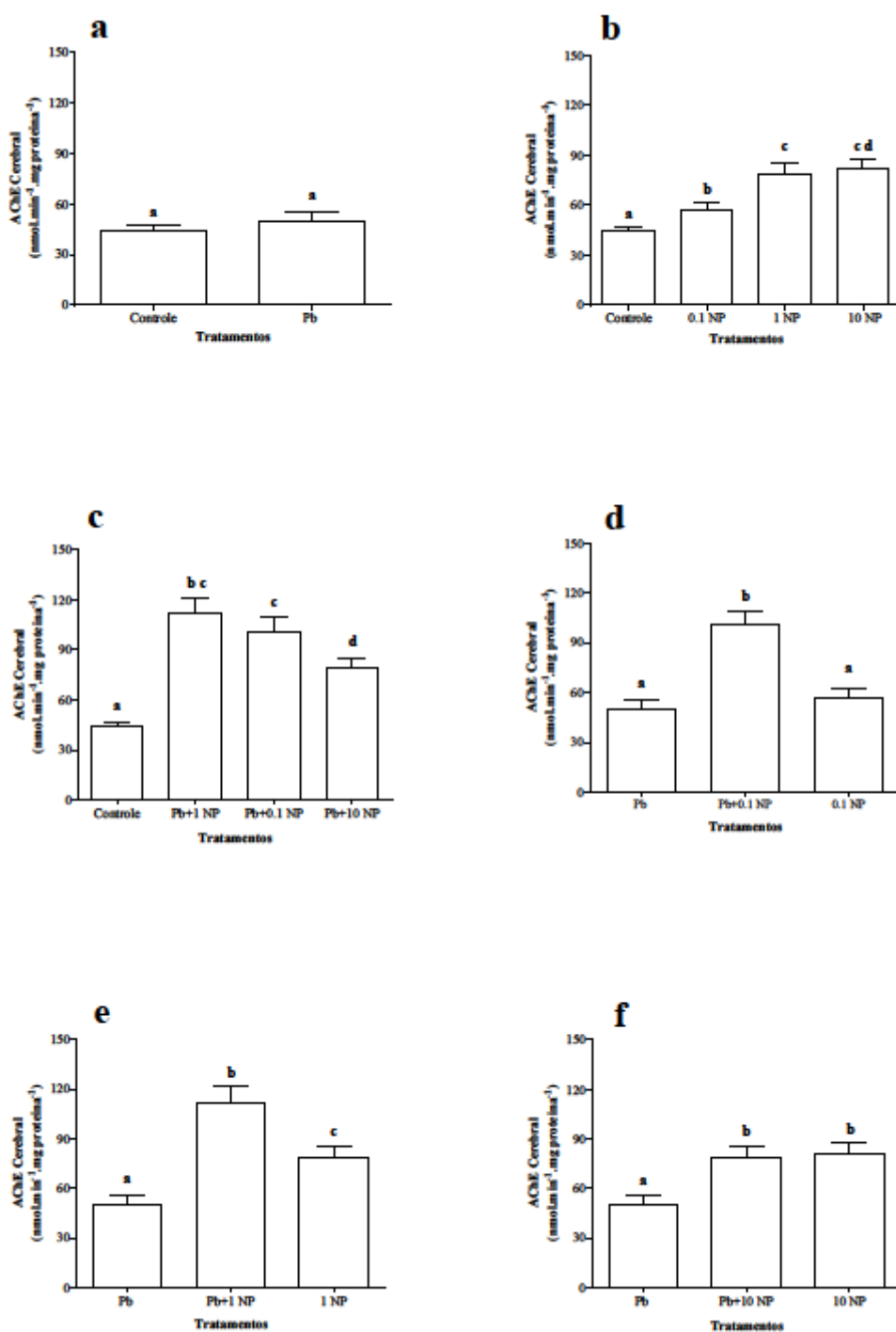
Unidade: mg Pb.kg de tecido úmido⁻¹

Biomarcadores de neurotoxicidade

O grupo exposto apenas ao chumbo não mostrou diferença na atividade da AChE cerebral com relação ao grupo controle ($p=0.2575$) (FIGURA 10 – a). Quando avaliamos a AChE cerebral dos exemplares expostos às nanopartículas de TiO₂, todos os grupos mostraram um aumento da atividade desta enzima, quando comparados ao grupo controle negativo (FIGURA 10 – b). Em relação aos três grupos de associação de contaminantes (Pb+NPs), os três grupos mostraram um aumento da atividade desta enzima, quando comparados com o controle negativo, porém dois grupos não mostraram diferenças entre si: Pb+0,1 NP e Pb+1 NP. O terceiro grupo de associação (Pb+10 NP) mostrou uma ativação enzimática, diferente do controle negativo, porém uma diminuição da atividade enzimática, quando comparado aos outros dois primeiros grupos (FIGURA 10 - c). Para as análises dos grupos de associação, foi possível verificar um aumento da atividade enzimática para os três grupos de associação (Pb+0,1 NP; Pb+1 NP e Pb+10 NP), quando comparadas ao grupo que foi exposto somente ao chumbo de forma isolada (FIGURA 10 - d, e, f) porém, os grupos expostos às nanopartículas de forma isolada também apresentaram um aumento da atividade da enzima, não de forma tão pronunciada quanto os grupos em associação, porém diferentes

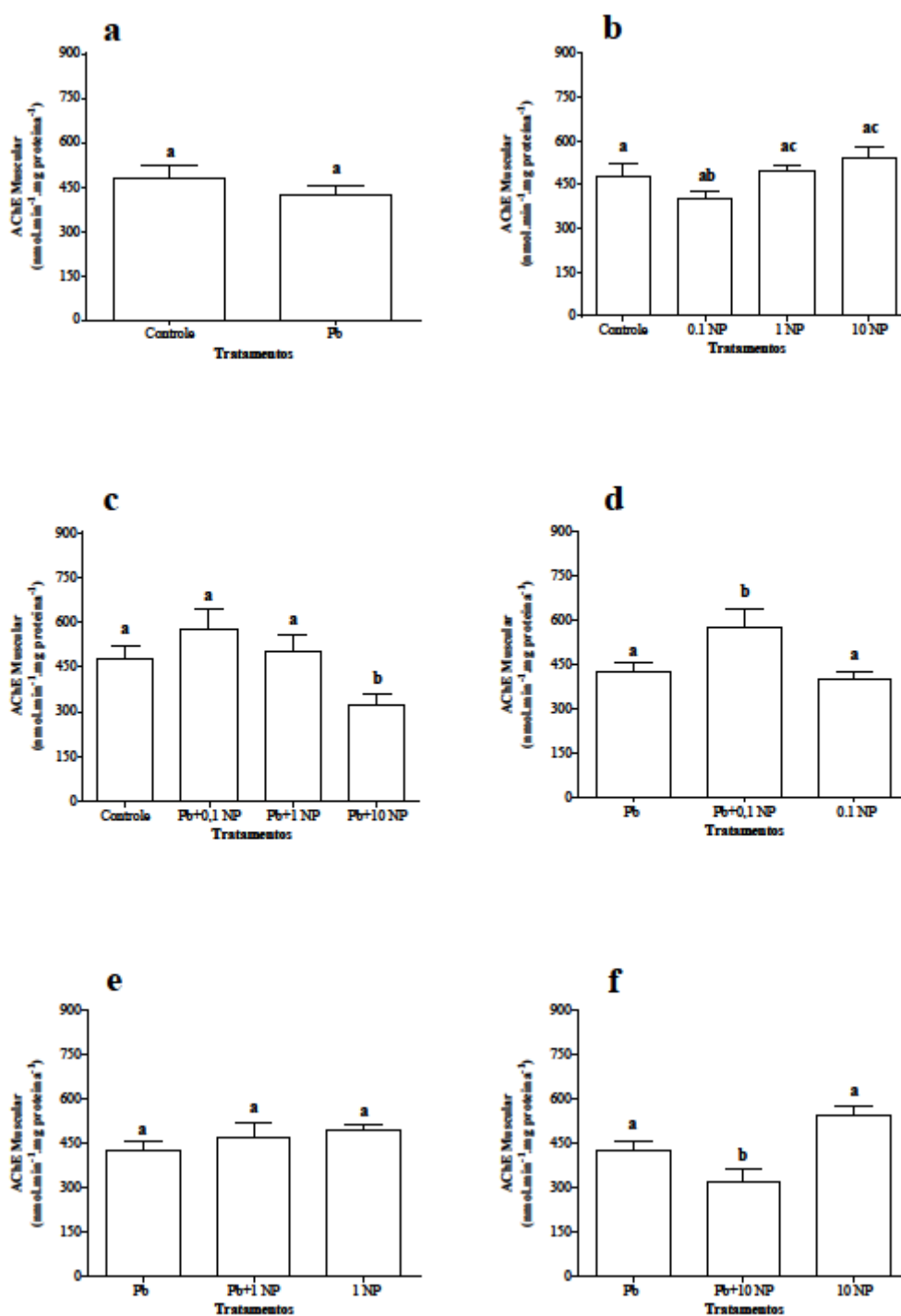
do grupo exposto somente ao chumbo, com exceção do grupo de análise d (FIGURA 10 - d, e, f).

FIGURA 10 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) CEREBRAL EM *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA. Pb: CHUMBO (21 mg/g); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Pb+0.1 NP), 1 µg/g (Pb+1 NP), 10 µg/g (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($P < 0,05$).



Os resultados encontrados para a atividade da AChE muscular diferem, em alguns aspectos, aos resultados encontrados para a AChE cerebral. O grupo exposto apenas ao chumbo não mostrou diferença na atividade da AChE muscular com relação ao grupo controle ($p=0.1636$) (FIGURA 11 – a). Quando avaliamos a atividade da AChE muscular dos grupos expostos apenas às nanopartículas de TiO_2 , os três grupos não apresentam alterações na atividade desta enzima com relação ao grupo controle, porém apresentaram diferenças entre si, sendo que o grupo exposto à menor dose demonstrou uma diminuição na atividade da enzima, quando comparado aos outros dois grupos expostos às doses maiores de nanopartículas de TiO_2 (FIGURA 11 – b). Em relação aos grupos expostos à associação dos contaminantes, apenas o grupo Pb+10 NP, exposto à maior dose de nanopartículas de TiO_2 mostrou uma diminuição da atividade da enzima AChE muscular quando comparado ao grupo controle negativo (FIGURA 11 – c). Para as análises dos grupos expostos à associação de contaminantes, o grupo de análise estatística (d) mostrou um aumento da atividade da enzima AChE muscular para o grupo Pb+0,1 NP, em relação aos dois grupos dos contaminantes de forma isolada (FIGURA 11 – d). O grupo de análise estatística (e) não apresentou nenhuma modificação na atividade da enzima AChE muscular (FIGURA 11 – e). Diferentemente dos outros grupos, e em oposição ao primeiro grupo de análise, o grupo (f) mostrou uma diminuição da atividade da enzima AChE muscular para o grupo exposto ao Pb+10 NP, em relação aos dois grupos de contaminantes de forma isolada (FIGURA 11 – f).

FIGURA 11 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) MUSCULAR EM *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE: Pb: CHUMBO (21 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

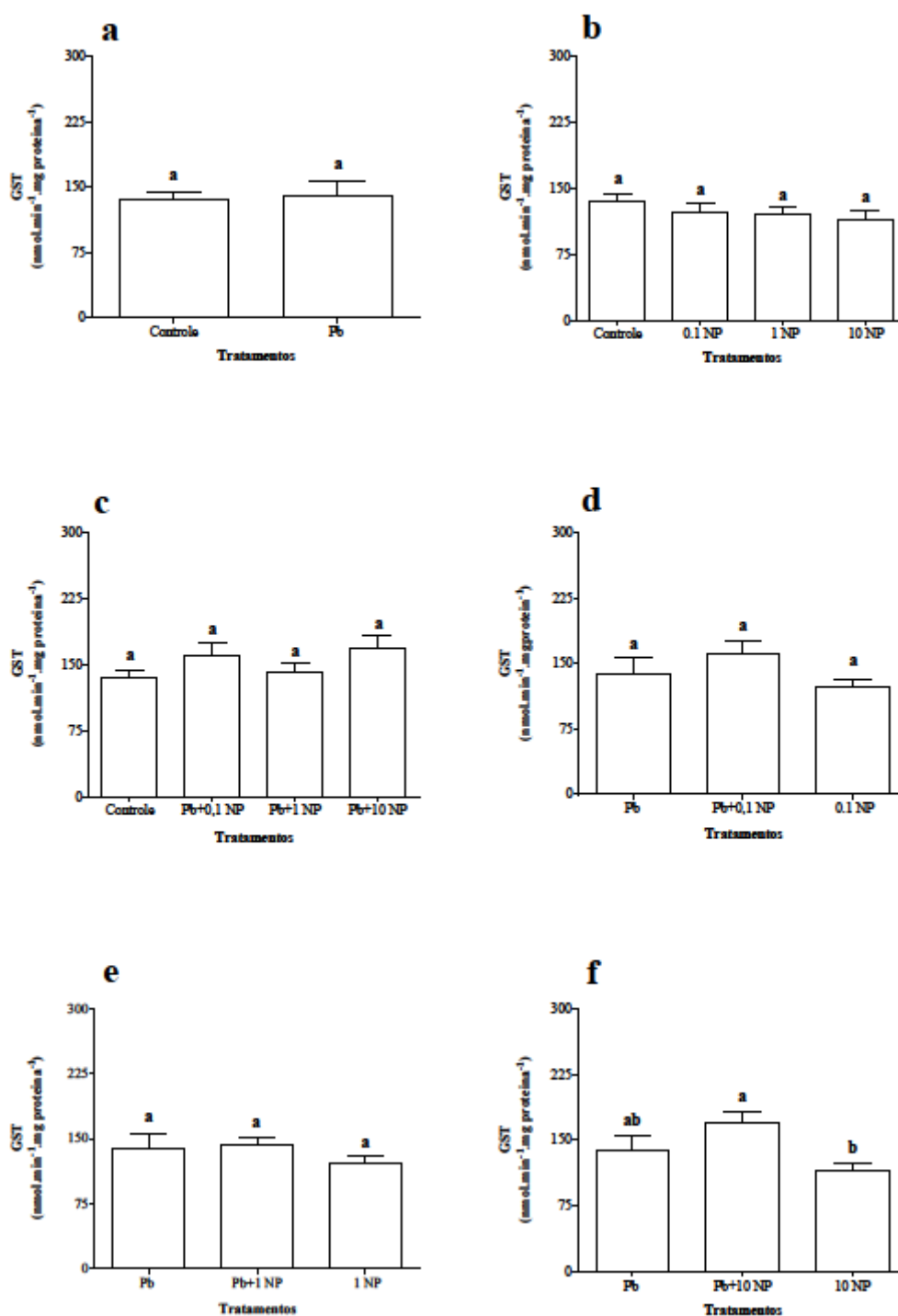


Biomarcadores de biotransformação

Ao avaliarmos a atividade das GSTs hepáticas, poucos resultados mostraram ser significativos. O grupo exposto apenas ao metal chumbo não mostrou diferenças significativas com relação ao grupo controle negativo (FIGURA 12 – a), assim como os grupos expostos apenas às nanopartículas de TiO_2 (FIGURA 12 –b) e os grupos expostos à combinação destes dois contaminantes (FIGURA 12 – c). Em relação aos grupos de análise estatística que avaliam se existe alguma diferença de resposta entre os grupos expostos aos contaminantes de forma isolada ou quando expostos de forma conjunta, aos grupos (d) e (e) não demonstraram diferenças estatísticas (FIGURA 12 – d, e), porém, o grupo de análise (f) mostrou que o grupo exposto apenas à nanopartícula de TiO_2 (10 NP) apresentou uma redução da atividade de GST em relação ao grupo exposto à associação de contaminantes (Pb+10 NP); além disso, ambos os grupos não diferiram do grupo exposto apenas ao chumbo (FIGURA 12 - f).

Para a atividade da EROD avaliada neste experimento, não foi verificado nenhum tipo de alteração ocasionada pelos contaminantes em questão (FIGURA 12 – a, b, c, d, e, f).

FIGURA 12 - ATIVIDADE DA GST EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. Pb: CHUMBO (21 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.



Para a atividade da EROD avaliada neste experimento, não foi verificado nenhum tipo de alteração ocasionada pelos contaminantes em questão (FIGURA 13 – a, b, c, d, e, f)

Biomarcadores de estresse oxidativo

Ao analisarmos o resultado da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), o grupo exposto ao chumbo de forma isolada apresentou uma diminuição da atividade desta enzima quando comparado ao grupo controle negativo ($p = 0,0063$) (FIGURA 14 – a). Os grupos expostos às nanopartículas de TiO_2 nas três diferentes concentrações, não apresentaram nenhuma alteração na atividade da SOD hepática em relação ao controle positivo (FIGURA 14 – b). Quando analisamos os três grupos de contaminantes associados, frente ao controle negativo, observamos uma inibição da atividade em dois destes grupos, a saber: Pb+0,1 NP e o Pb+1 NP. O terceiro grupo, com a maior dose de nanopartículas de TiO_2 não apresentou diferenças com relação ao controle negativo (FIGURA 14 – c).

Ao avaliarmos os grupos de associação dos contaminantes, com os grupos expostos aos contaminantes de forma isolada, o conjunto de análise estatística referente à menor concentração de nanopartículas de TiO_2 , não apresentou nenhuma diferença na atividade da enzima SOD (FIGURA 14 – d). Porém, ao avaliarmos os outros dois conjuntos, o grupo (e) apresentou um aumento da atividade da enzima SOD, apenas para os exemplares expostos às nanopartículas de TiO_2 (1 NP) (FIGURA 14 – e). Quando avaliamos o conjunto de análises f, observamos que existe uma tendência real ($p=0,0757$) do aumento da atividade da enzima para os exemplares expostos aos contaminantes de forma associada e aos contaminantes expostos apenas às nanopartículas (10 NP) (FIGURA 14 – f).

Os resultados das análises estatísticas para a atividade da enzima catalase (CAT) hepática mostraram que apenas um grupo de exposição de apenas um dos conjuntos de análise estatística possuiu uma alteração enzimática da catalase (FIGURA 15 – a, b, c, d, e, f). Ao analisarmos o conjunto estatístico (c), que analisa os grupos expostos à associação de contaminantes, o grupo exposto à Pb + 0,1 NP apresentou um aumento da atividade enzimática da CAT em relação ao grupo controle negativo. Os outros grupos não se mostraram diferentes do grupo controle negativo (FIGURA 15 – c).

FIGURA 13 - ATIVIDADE DA EROD EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. Pb: CHUMBO (21 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

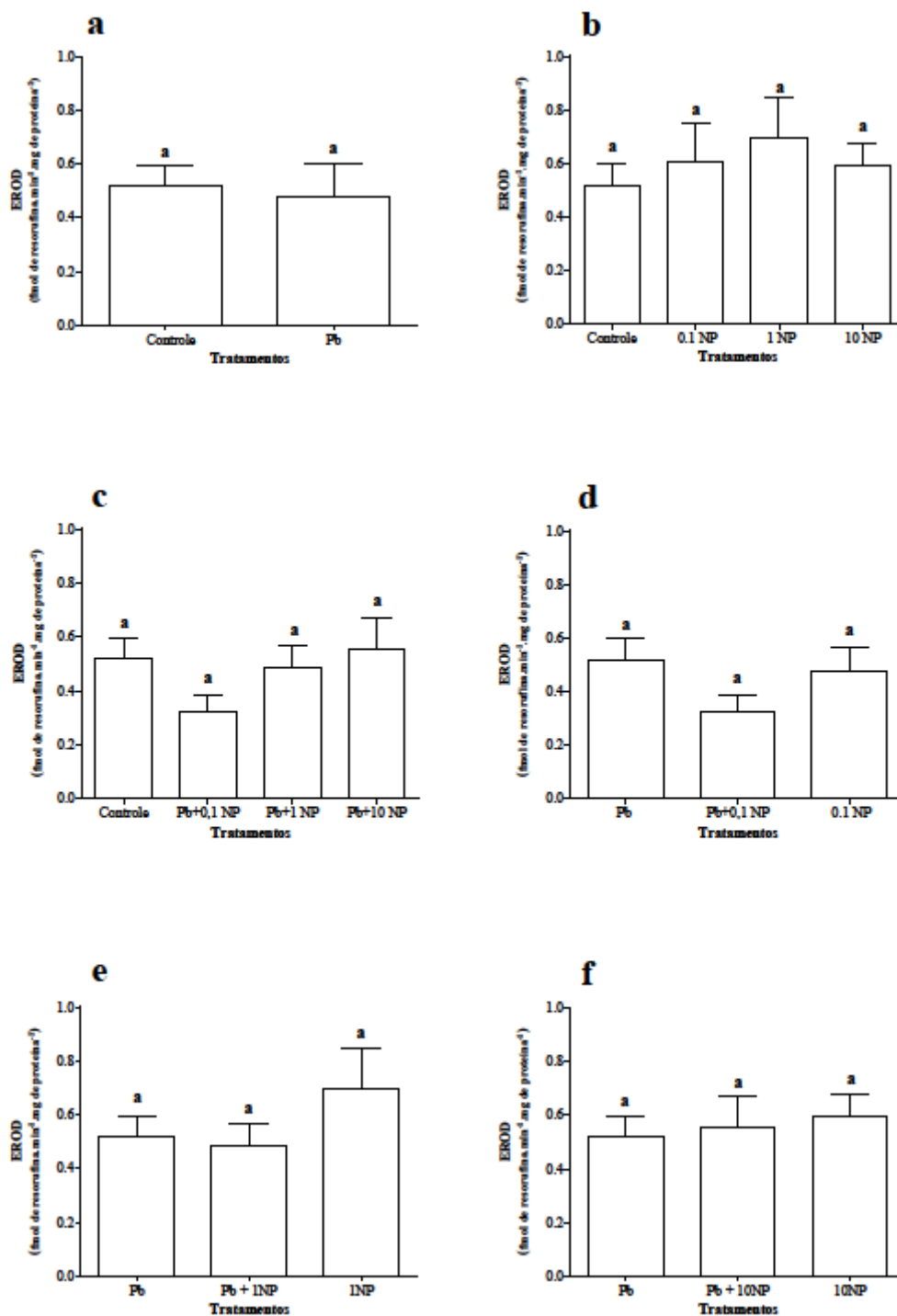
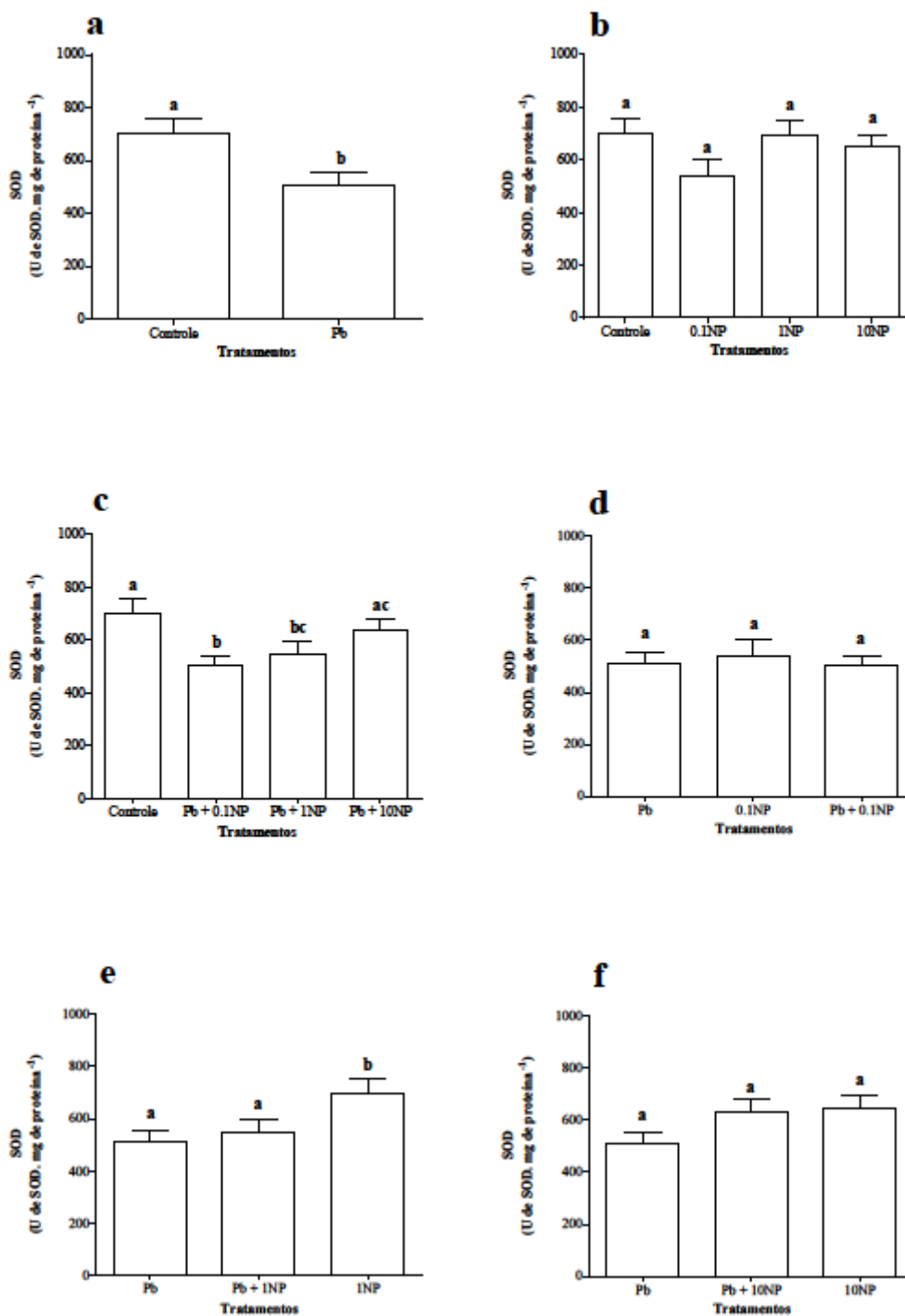


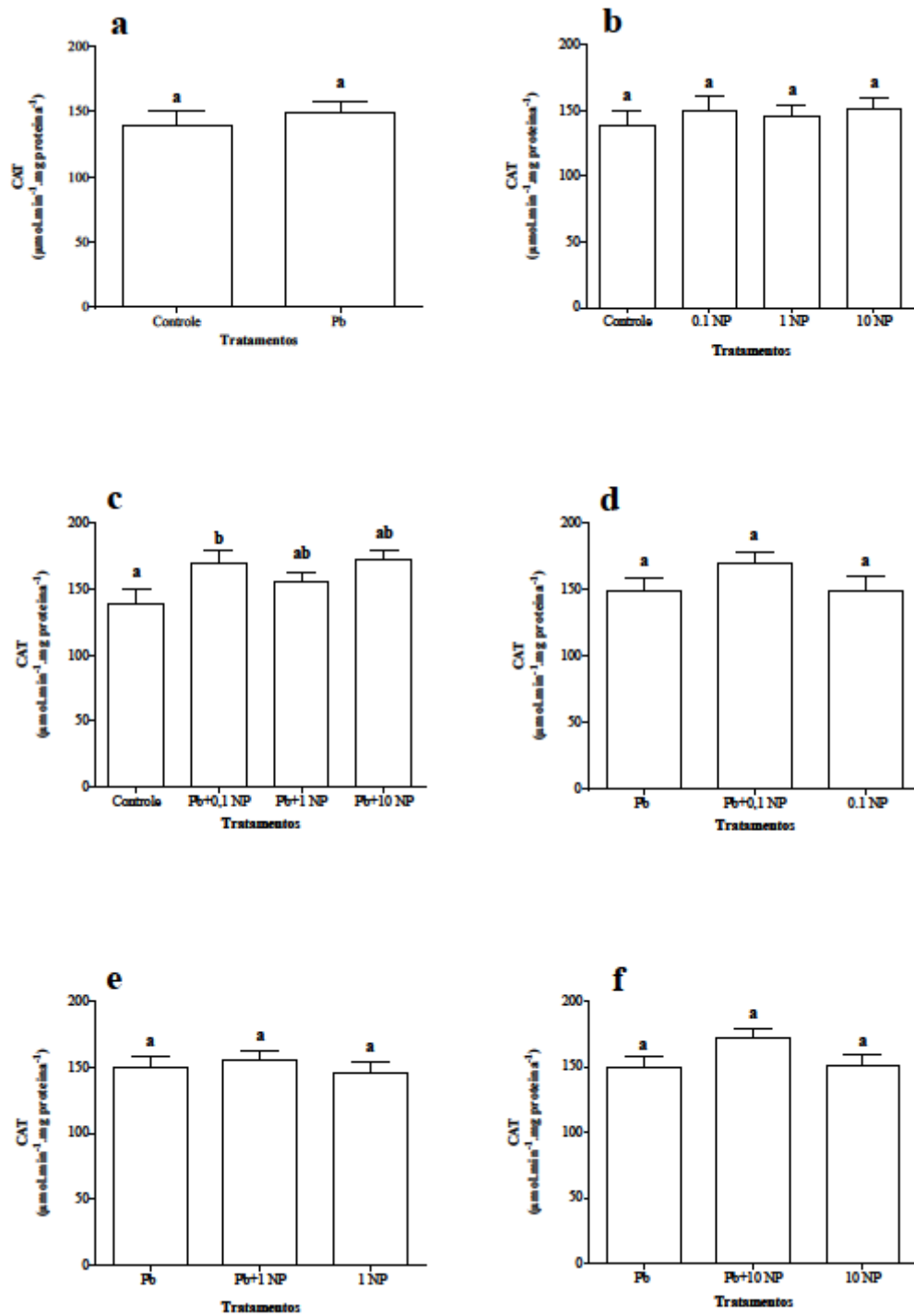
FIGURA 14 - ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. Pb: chumbo (21 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES De 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.



Alterações em macromoléculas

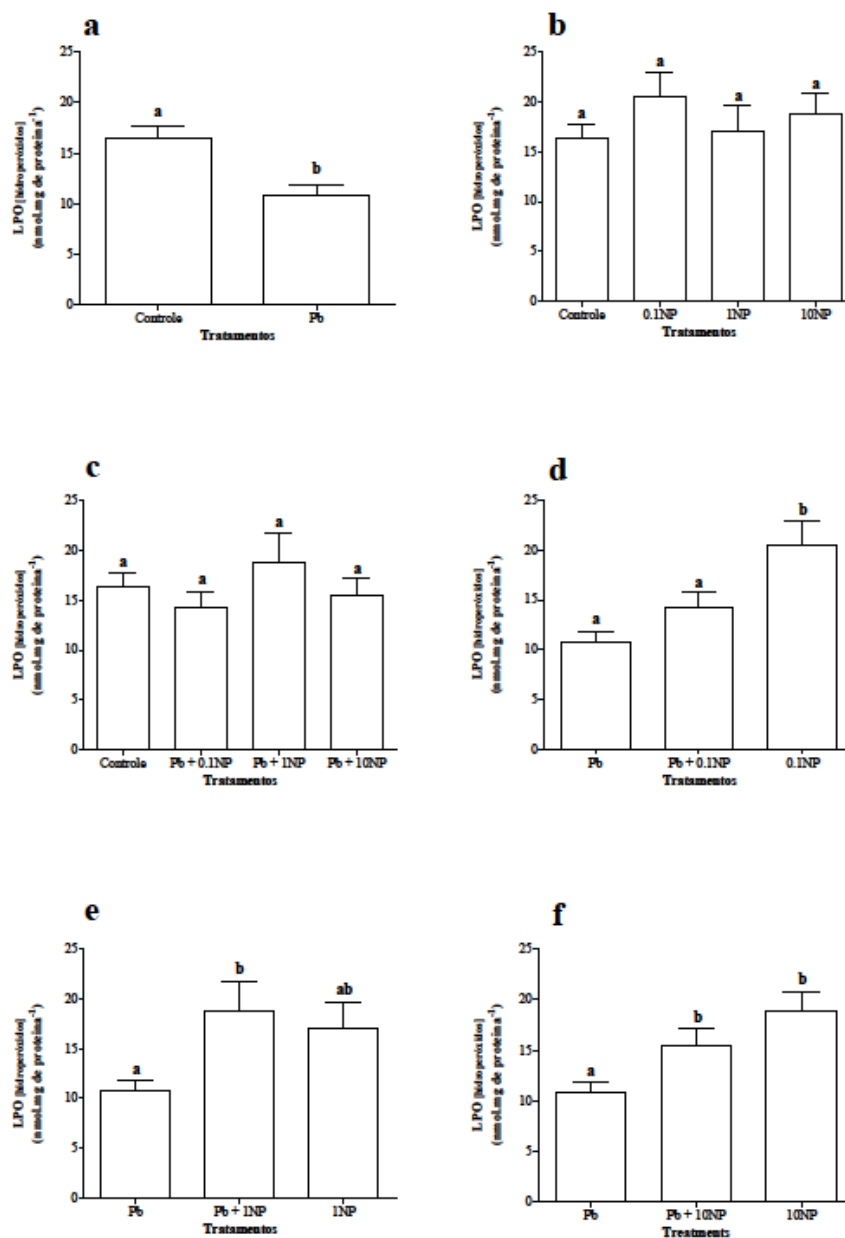
Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) avaliados neste experimento mostraram que, para o grupo exposto ao chumbo de forma isolada ocorreu uma diminuição da peroxidação lipídica, quando comparado ao grupo controle negativo (FIGURA 16 – a). Já para os conjuntos estatísticos que avaliam apenas os grupos expostos às nanopartículas de TiO_2 , bem como os grupos expostos as nanopartículas de TiO_2 associadas ao chumbo, não foi possível evidenciar qualquer alteração significativa (FIGURA 16 – b, c). Porém, com relação aos conjuntos estatísticos que avaliam a associação de contaminantes frente aos grupos que foram expostos a eles de forma isolada, os resultados foram diferentes. Para o conjunto de análise (d), apenas o grupo exposto às nanopartículas de TiO_2 (0,1 NP) mostrou um aumento da concentração de hidroperóxidos, em relação ao chumbo e ao grupo exposto aos contaminantes associados (FIGURA 16 – d).

FIGURA 15 - ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE (CAT) EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. Pb: CHUMBO (21 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.



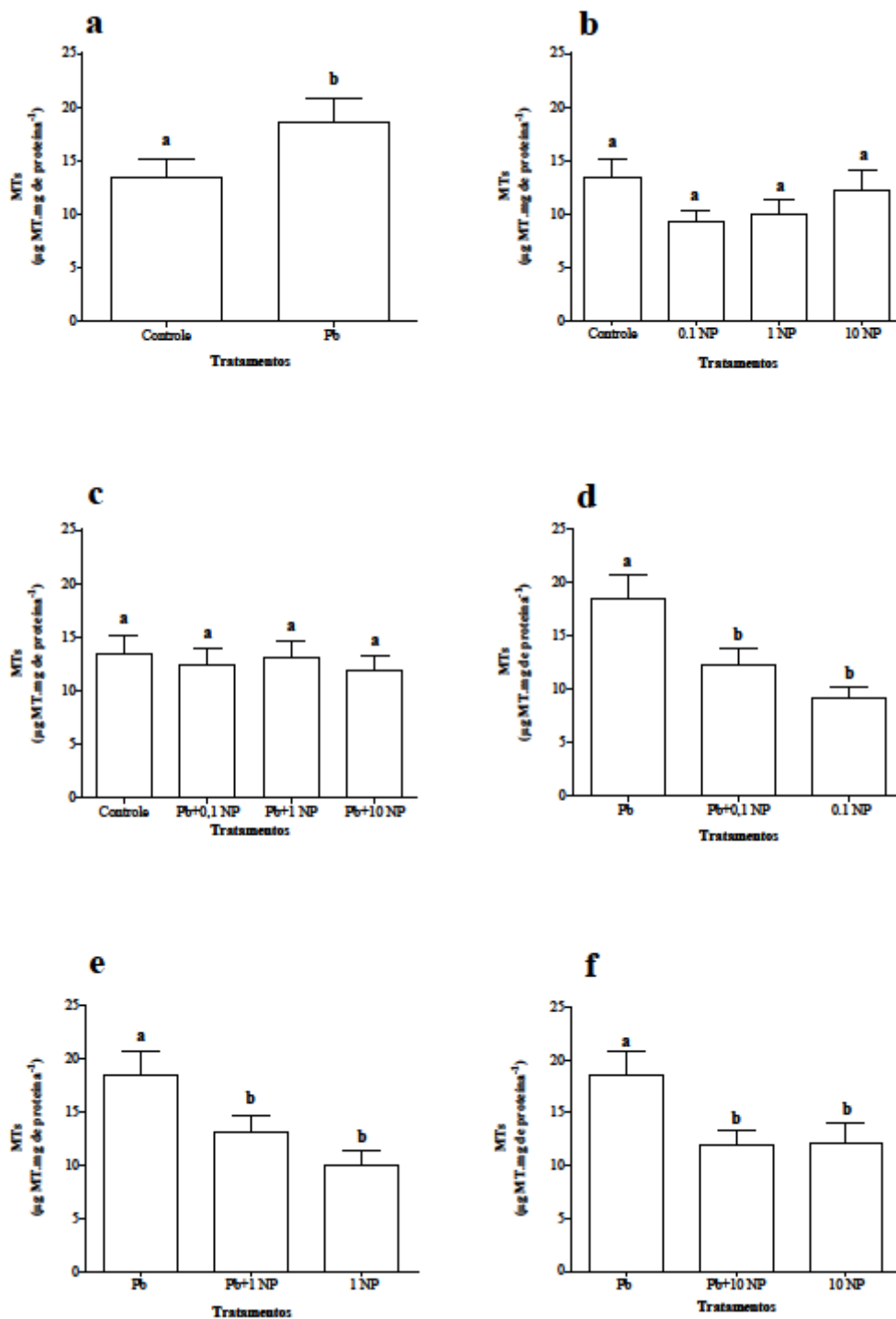
Já para o conjunto seguinte (e), os grupos expostos às nanopartículas e às nanopartículas associadas ao chumbo mostraram um aumento da peroxidação lipídica em relação ao chumbo (FIGURA 16 – e). Por fim, para o último conjunto estatístico (f), do mesmo modo que o conjunto anterior, os grupos expostos às nanopartículas e às nanopartículas associadas ao chumbo, mostraram um aumento da concentração de hidroperóxidos (FIGURA 16 – f).

FIGURA 16 - AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. Pb: CHUMBO (21 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.



A concentração de metalotioneínas nas células hepáticas mostrou um aumento em relação ao controle negativo, no grupo exposto ao metal chumbo de forma isolada ($p=0,0469$) (FIGURA 17 – a). Já para os conjuntos estatísticos que avaliam apenas os grupos expostos às nanopartículas de TiO_2 , bem como os grupos expostos as nanopartículas de TiO_2 associadas ao chumbo, não foi possível evidenciar qualquer alteração significativa na concentração de metalotioneínas neste tipo celular, em relação ao grupo controle negativo (FIGURA 17 – b, c). Porém, para os três conjuntos estatísticos que analisam a associação de contaminantes frente aos grupos que foram expostos a eles de forma isolada, os resultados foram semelhantes: os grupos expostos apenas às nanopartículas de TiO_2 e os grupos expostos à associação de nanopartículas de TiO_2 e chumbo apresentaram uma diminuição na concentração de metalotioneínas, em relação ao grupo exposto ao chumbo (FIGURA 17 – d, e, f).

FIGURA 17 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS (MTs) EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. Pb: CHUMBO (21 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Pb+0.1 NP), 1 µg/g (Pb+1 NP), 10 µg/g (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.



Biomarcadores genéticos

Teste do micronúcleo písceo e alterações morfológicas nucleares

Ao considerarmos o total de alterações morfológicas nucleares, juntamente com o número de micronúcleos encontrados, observamos que o conjunto de análise (e) mostrou, para o grupo exposto às nanopartículas de TiO_2 e o chumbo, um decréscimo no número de alterações encontradas, em relação aos grupos expostos aos contaminantes de forma isolada. Os outros conjuntos de análise não mostraram diferenças significativas em relação ao número de alterações totais encontradas (FIGURA 18 – a, b, c, d, f).

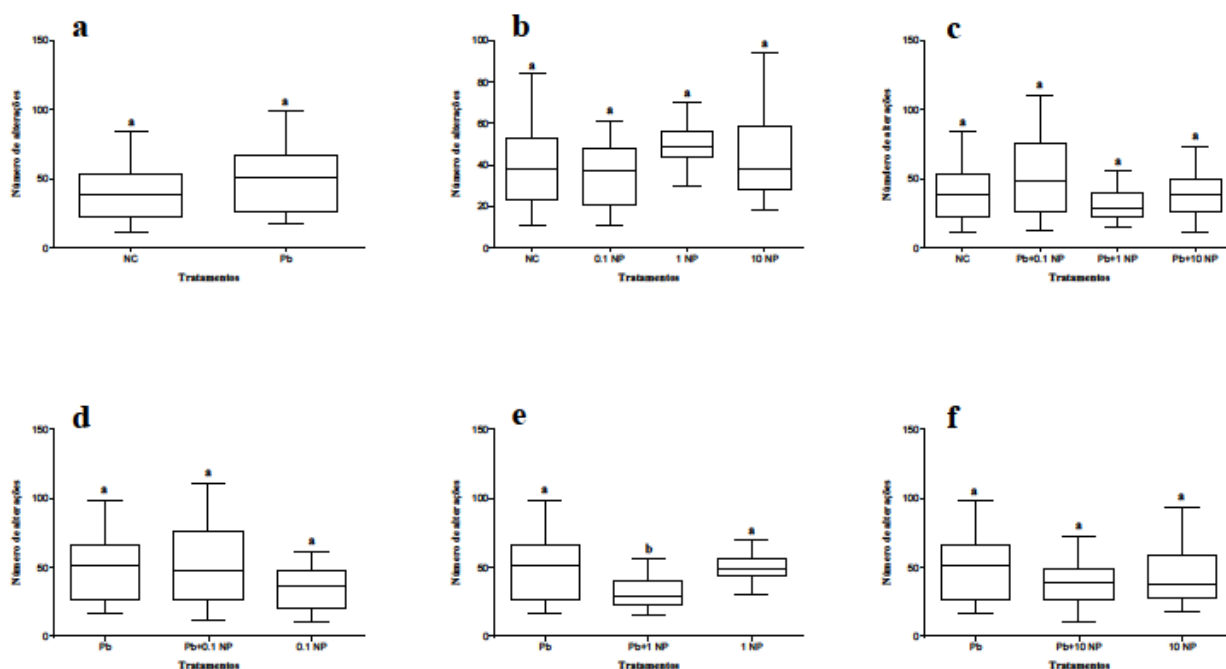
As análises realizadas separadamente para cada tipo de alteração morfológica nuclear analisada neste estudo, bem como para os micronúcleos, se encontram na TABELA 4. A análise dos micronúcleos mostrou uma diferença nas alterações encontradas para o conjunto de análise (a), mostrando um aumento do número de micronúcleos no grupo exposto ao metal chumbo. A análise de alterações do tipo *blebbed* e *vacuolated* mostraram resultados coincidentes, com alterações verificadas no mesmo conjunto de análise: (e). Para o conjunto de análise do tipo *blebbed*, o grupo exposto à associação Pb+1 NP mostrou um número de alterações diferente em relação aos grupos expostos aos contaminantes isolados. Para o conjunto de análise do tipo *vacuolated*, o grupo exposto à associação de contaminantes Pb+1 NP mostrou resultados diferentes do grupo exposto à nanopartículas de TiO_2 de forma isolada (1 NP).

Do mesmo modo, as análises para as alterações do tipo *notched* e *lobed* foram coincidentes para os conjuntos de análise (a), (b) e (c), apresentando resultados significativos.

TABELA 4 - FREQUÊNCIA MÉDIA DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES EM ERITRÓCITOS DE *Hoplias intermedius*, SEPARADAS ENTRE MICRONÚCLEO, BINÚCLEO, BLEBBED, LOBED, NOTCHED, VACUOLATED E TOTAL DE AMN. COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES CONJUNTOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA. VALORES EXPRESSOS EM MÉDIA E ERRO PADRÃO. A PRESENÇA DE ASTERISCO INDICA DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS E O CONTROLE. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS, APENAS.

	TRATAMENTOS	MN	BINUCLEO	BLEBBED	LOBED	NOTCHED	VACUOLATED	TOTAL AMN
A	CN	0.1034 ± 0.4093	0.2759 ± 0.5276	2.9660 ± 2.5980	1.1030 ± 2.0060	11.720 ± 8.548	23.720 ± 13.980	39.070 ± 19.230
	Pb	0.6111 ± 0.7775*	0.4444 ± 1.2470	4.2780 ± 3.6750	2.3890 ± 2.3040*	24.780 ± 16.500*	19.330 ± 11.700	51.130 ± 23.400
B	CN	0.1034 ± 0.4093	0.2759 ± 0.5276	2.9660 ± 2.5980	1.1030 ± 2.0060	11.720 ± 8.548	23.720 ± 13.980	39.070 ± 19.230
	0,1 NP	0.0625 ± 0.2500	0.4375 ± 0.7274	2.4380 ± 1.2090	1.7500 ± 2.0170	16.250 ± 9.692*	21.750 ± 20.930	36.330 ± 14.620
	1 NP	0.2778 ± 0.4609	0.3889 ± 0.6978	3.7220 ± 2.8660	2.3330 ± 2.2230*	20.110 ± 6.096*	26.830 ± 14.450	50.000 ± 10.400
	10 NP	0.2632 ± 0.5620	0.2632 ± 0.6534	3.1050 ± 2.2580	2.9440 ± 3.4380*	18.580 ± 12.940*	25.320 ± 18.740	44.440 ± 20.430
C	CN	0.1034 ± 0.4093	0.2759 ± 0.5276	2.9660 ± 2.5980	1.1030 ± 2.0060	11.720 ± 8.548	23.720 ± 13.980	39.070 ± 19.230
	Pb + 0,1 NP	0.3529 ± 0.7019	0.5882 ± 1.2280	2.9330 ± 3.6740	3.4710 ± 3.0850*	26.650 ± 16.830*	17.590 ± 12.190	51.650 ± 29.460
	Pb + 1 NP	0.2941 ± 0.5879	0.7059 ± 1.5320	1.6670 ± 1.6330	1.8240 ± 1.5900*	17.760 ± 7.973*	12.670 ± 7.952	31.140 ± 12.390
	Pb + 10 NP	0.1765 ± 0.3930	0.2941 ± 0.6860	3.8000 ± 3.5700	2.1760 ± 2.8560*	21.820 ± 12.660*	19.000 ± 12.890	39.530 ± 17.780
D	Pb	0.6111 ± 0.7775	0.4444 ± 1.2470	4.2780 ± 3.6750	2.3890 ± 2.3040	24.780 ± 16.500	19.330 ± 11.700	51.130 ± 23.400
	Pb + 0,1 NP	0.3529 ± 0.7019	0.5882 ± 1.2280	2.9330 ± 3.6740	3.4710 ± 3.0850	26.650 ± 16.830	17.590 ± 12.190	51.650 ± 29.460
	0,1 NP	0.0625 ± 0.2500	0.4375 ± 0.7274	2.4380 ± 1.2090	1.7500 ± 2.0170	16.250 ± 9.692	21.750 ± 20.930	36.330 ± 14.620
E	Pb	0.6111 ± 0.7775	0.4444 ± 1.2470	4.2780 ± 3.6750^a	2.3890 ± 2.3040	24.780 ± 16.500	19.330 ± 11.700	51.130 ± 23.400
	Pb + 1 NP	0.2941 ± 0.5879	0.7059 ± 1.5320	1.6670 ± 1.6330^b	1.8240 ± 1.5900	17.760 ± 7.973	12.670 ± 7.952^a	31.140 ± 12.390
	1 NP	0.2778 ± 0.4609	0.3889 ± 0.6978	3.7220 ± 2.8660^b	2.3330 ± 2.2230	20.110 ± 6.096	26.830 ± 14.450^b	50.000 ± 10.400
F	Pb	0.6111 ± 0.7775	0.4444 ± 1.2470	4.2780 ± 3.6750	2.3890 ± 2.3040	24.780 ± 16.500	19.330 ± 11.700	51.130 ± 23.400
	Pb + 10 NP	0.1765 ± 0.3930	0.2941 ± 0.6860	3.8000 ± 3.5700	2.1760 ± 2.8560	21.820 ± 12.660	19.000 ± 12.890	39.530 ± 17.780
	10 NP	0.2632 ± 0.5620	0.2632 ± 0.6534	3.1050 ± 2.2580	2.9440 ± 3.4380	18.580 ± 12.940	25.320 ± 8.740	44.440 ± 20.430

FIGURA 18 - NÚMERO DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES E MICRONÚCLEOS EM ERITRÓCITOS DE *Hoplias intermedius*. Pb: CHUMBO (21 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Pb+0.1 NP), 1 µg/g (Pb+1 NP), 10 µg/g (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.



Ensaio Cometa

Ensaio cometa em eritrócitos

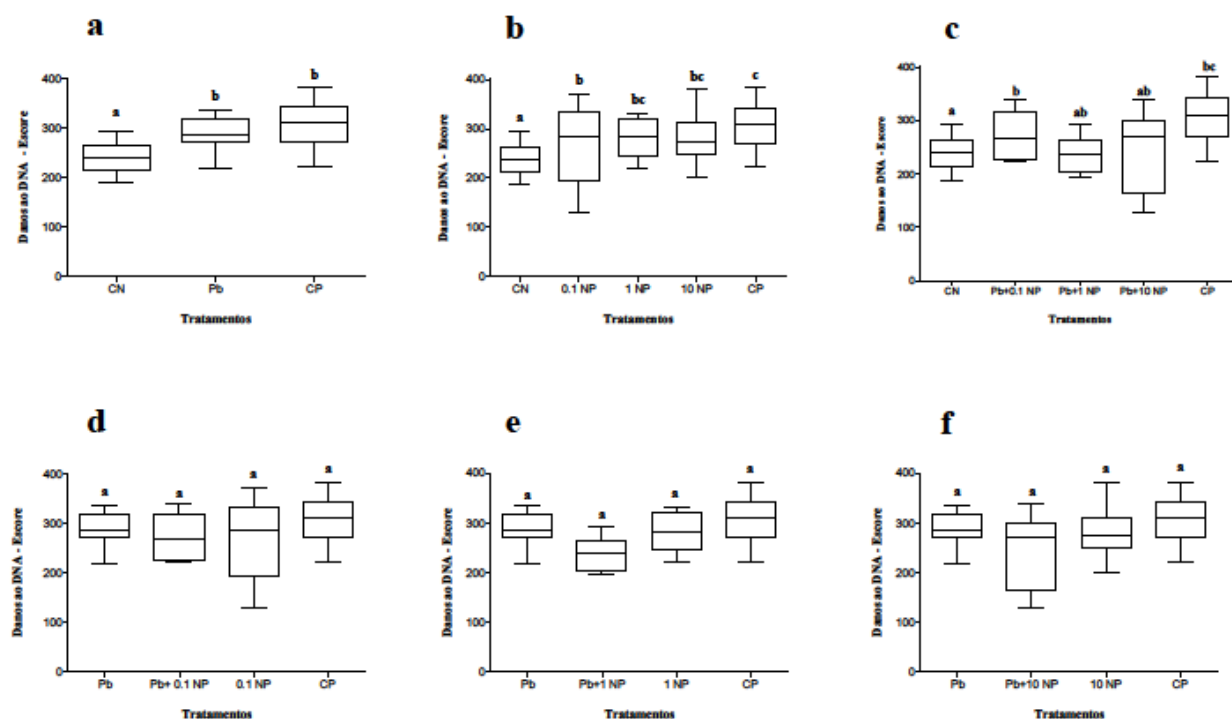
Em relação ao conjunto de análise (a), o chumbo apresentou um maior índice de danos no material genético, quando comparado ao controle negativo (FIGURA 19 – a). Em relação ao conjunto de análise (b), que avalia apenas a resposta das nanopartículas frente ao controle negativo, os três grupos expostos às nanopartículas apresentaram diferenças, sendo que duas dessas concentrações (1 NP e 10NP) mostraram um nível de dano similar ao grupo controle positivo (FIGURA 19 – b). Já o conjunto de análise (c) que avalia os grupos expostos a combinação dos contaminantes em relação ao grupo controle negativo, o grupo exposto à menor concentração de nanopartículas em associação com o chumbo (Pb + 0.1 NP), apresentou diferenças em relação ao controle negativo (FIGURA 19 – c). Os outros dois

grupos expostos às combinações de Pb + 1 NP e Pb+ 10 NP, não apresentaram diferenças com relação ao grupo controle negativo (FIGURA 19 – c).

Para os conjuntos de análise (d), (e) e (f), que avaliam os grupos expostos à combinação de contaminantes em comparação a ambos os contaminantes de forma isolada, o conjunto de análise (d) que avalia a menor concentração de nanopartículas de TiO_2 , não demonstrou nenhuma diferença entre os grupos, assim como o conjunto de análise F, que por sua vez avalia a maior concentração de TiO_2 .

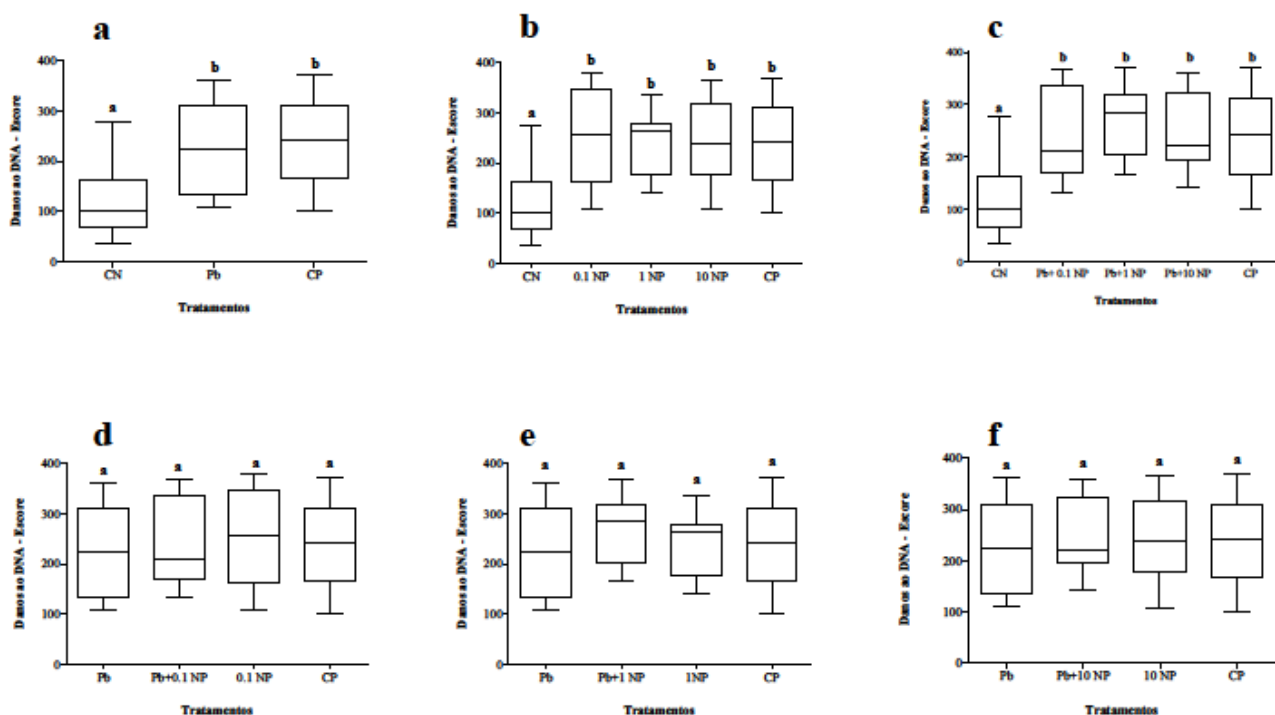
Porém, quando observamos o conjunto de análise (e), o grupo exposto à associação de contaminantes (Pb + 1 NP) apresentou uma redução de danos genéticos, quando comparado aos grupos de forma isolada (Pb e 1 NP) (FIGURA 19 – d, e, f).

FIGURA 19 - DANOS AO DNA DE ERITRÓCITOS DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. Pb: CHUMBO (21 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.



Para o ensaio cometa em brânquias, os danos ao material genético foram bem evidentes quando avaliamos os grupos expostos frente ao controle negativo: os conjuntos de análise (a), (b), (c). No conjunto de análises (a) podemos perceber que o grupo exposto ao chumbo causou danos ao material genético das brânquias de forma similar ao controle positivo. Já para os conjuntos de análises (b) e (c), ambos apresentaram o mesmo padrão de resposta, apontando todos os grupos expostos com aumento do dano genético em relação ao grupo controle negativo (FIGURA 20 – a, b, c). Tanto no conjunto (b) quanto no conjunto (c), os grupos expostos causaram danos ao material genético equiparável aos danos verificado no grupo controle positivo. Quando observamos as respostas dos conjuntos de análise (d), (e) e (f), verificamos que não houve nenhuma resposta significativa, ou seja, não houve diferença na resposta dos grupos expostos aos contaminantes de forma associada em relação aos grupos expostos aos respectivos contaminantes de forma isolada (FIGURA 20 – d, e, f).

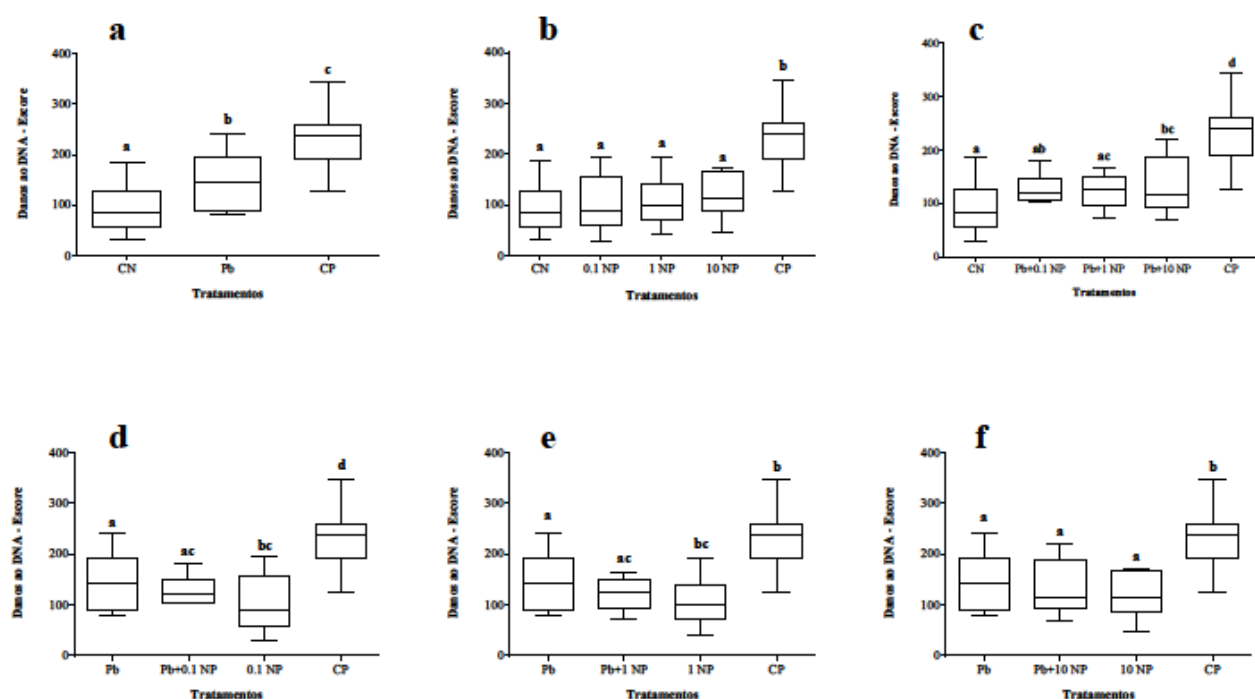
FIGURA 20 - DANOS AO DNA DAS BRÂNQUIAS DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. Pb: CHUMBO (21 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.



Ensaio cometa fígado

Para as análises do ensaio cometa do fígado, no conjunto de análises (a) novamente foi possível verificar o aumento nos danos ao material genético após a exposição ao chumbo (FIGURA 21 – a). Para este tecido, novamente, o dano ocasionado foi semelhante ao dano ocasionado pelo grupo exposto ao controle positivo. Para o conjunto de análises (b), não foi possível verificar diferenças entre o grupo controle negativo e os grupos expostos às diferentes concentrações de nanopartículas de TiO_2 (FIGURA 21 - b). Já para o conjunto de análises (c), o grupo exposto à combinação de Pb + 10 NP, mostrou um aumento do número de danos ao DNA em relação ao grupo controle negativo ($p=0.0574$) (FIGURA 21 – c). Os outros dois grupos não mostraram diferenças com relação ao controle negativo. Para o conjunto de análises (d), o grupo exposto à associação dos contaminantes não demonstrou diferenças em relação aos grupos expostos aos contaminantes de forma isolada, assim como o conjunto de análises (e) e (f), porém os danos encontrados para o grupo exposto ao metal chumbo foram maiores que os encontrados no grupo exposto apenas às nanopartículas nos conjuntos de análises (d) e (e) (FIGURA 21 – d, e, f).

FIGURA 21 - DANOS AO DNA DO FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. Pb: CHUMBO (21 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

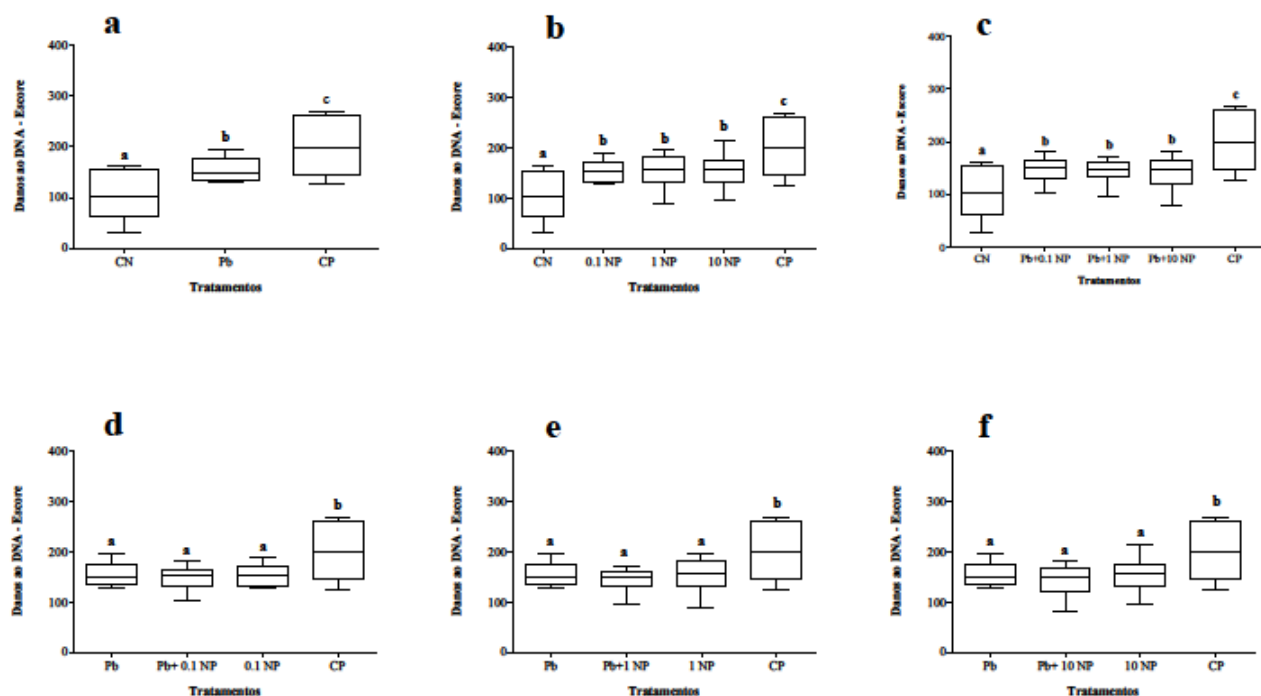


Ensaio cometa rim posterior

Para o ensaio cometa realizado com o rim posterior, os danos ao material genético foram bem evidentes quando avaliamos os grupos expostos frente ao controle negativo: os conjuntos de análises (a), (b), (c). No conjunto de análises (a) podemos perceber que o grupo exposto ao chumbo causou danos ao material genético das células do rim (FIGURA 22 – a). Quando avaliamos os conjuntos de análises (b) e (c), ambos apresentaram o mesmo padrão de resposta, apontando todos os grupos expostos com aumento do dano genético em relação ao grupo controle negativo (FIGURA 22 – b, c). Posteriormente, ao observarmos as respostas dos conjuntos de análise (d), (e) e (f), verificamos que não houve nenhuma resposta significativa

em nenhum dos conjuntos, ou seja, não houve diferença na resposta dos grupos expostos aos contaminantes de forma associada em relação aos grupos expostos aos respectivos contaminantes de forma isolada (FIGURA 22 – d, e, f).

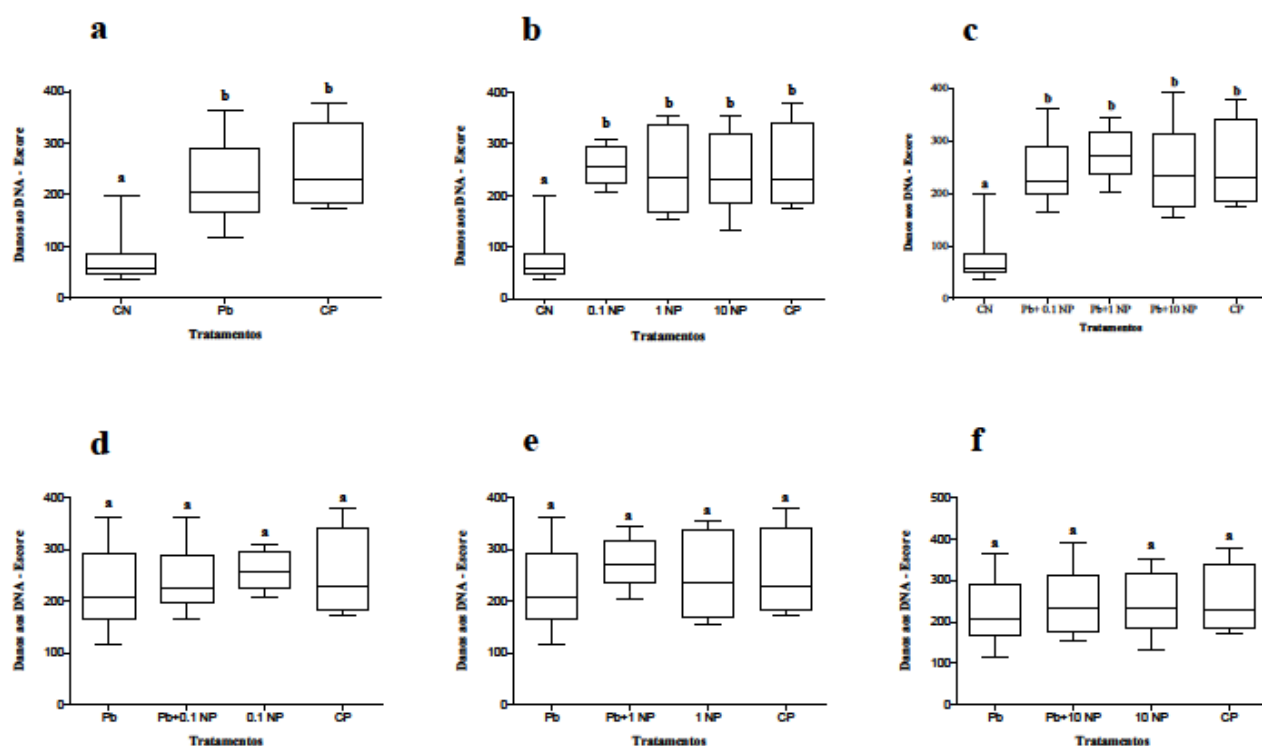
FIGURA 22 - DANOS AO DNA DO RIM POSTERIOR DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. Pb: CHUMBO (21 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Pb+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.



Ensaio cometa cérebro

Ao analisarmos os conjuntos estatísticos de análise referentes ao ensaio cometa do cérebro, verificamos que para o conjunto de análises (a), novamente o chumbo mostrou um aumento dos danos ao material genético em relação ao controle negativo, danos estes que foram equiparáveis à quantidade de danos encontrados no controle positivo (FIGURA 23 – a). Novamente, análise estatística para os conjuntos (b) e (c) mostraram respostas semelhantes, nos quais podemos perceber um aumento nos danos dos grupos expostos, com danos semelhantes aos ocasionados pelo controle positivo (FIGURA 23 –b, c). Ao analisarmos as respostas dos conjuntos de análise (d), (e) e (f), verificamos que não houve nenhuma resposta significativa em nenhum dos conjuntos, ou seja, não houve diferença na resposta dos grupos expostos aos contaminantes de forma associada em relação aos grupos expostos aos respectivos contaminantes de forma isolada, assim como aconteceu para o ensaio cometa realizado para o rim posterior (FIGURA 23– d, e, f).

FIGURA 23 - DANOS AO DNA ENCONTRADOS NO CÉREBRO DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. Pb: CHUMBO (21 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Pb+0.1 NP), 1 µg/g (Pb+1 NP), 10 µg/g (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 MG/G (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

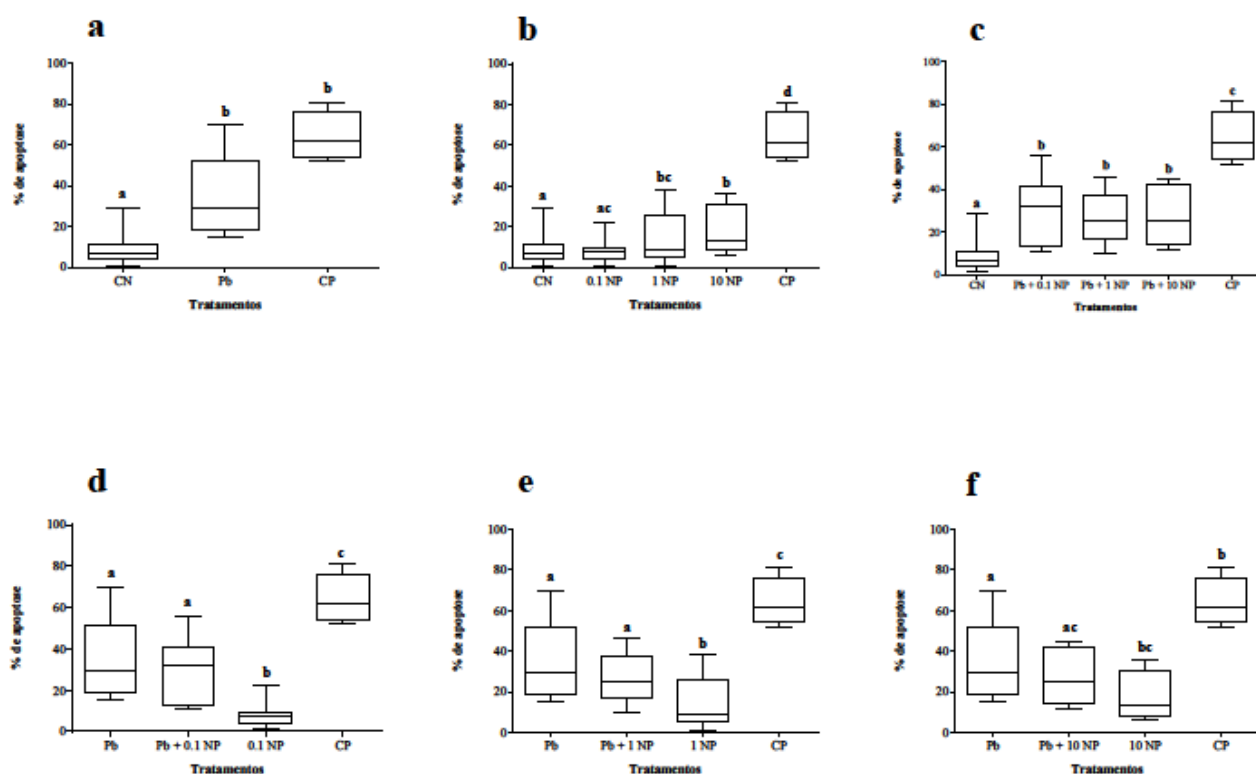


Ensaio de Difusão do DNA em eritrócitos

A análise do ensaio de difusão do DNA em eritrócitos mostrou que o grupo exposto ao chumbo apresentou uma frequência maior de células em apoptose, quando comparado ao grupo controle negativo (conjunto de análises a – FIGURA 24 – a). Para o conjunto de análises (b), que avalia a frequência de apoptose dos grupos expostos às nanopartículas em relação ao grupo controle negativo, os grupos expostos às concentrações de 1 NP e 10 NP, as duas maiores concentrações de apresentaram uma maior frequência de células em apoptose (FIGURA 24 – b). Já o conjunto de análises que avalia os grupos expostos às associações entre os contaminantes (c), todos os grupos expostos à associação apresentaram uma frequência maior de apoptose em relação ao controle negativo, porém eles não apresentaram diferenças nesta frequência entre si (FIGURA 24 – c). Para os conjuntos de análise (d), (e) e

(f), que avaliam a frequência de apoptose dos grupos de exposição à combinação de contaminantes em relação aos grupos expostos aos contaminantes de forma isolada, as respostas foram semelhantes: os grupos expostos apenas às nanopartículas apresentaram uma frequência de apoptose menor do que a frequência observada para o chumbo e para a associação dos contaminantes. Além disso, para conjunto de análises (f), o grupo exposto apenas às nanopartículas (10 NP) não apresentou diferenças com relação ao grupo exposto à associação de contaminantes (Pb+10 NP) (FIGURA 24 – d, e, f).

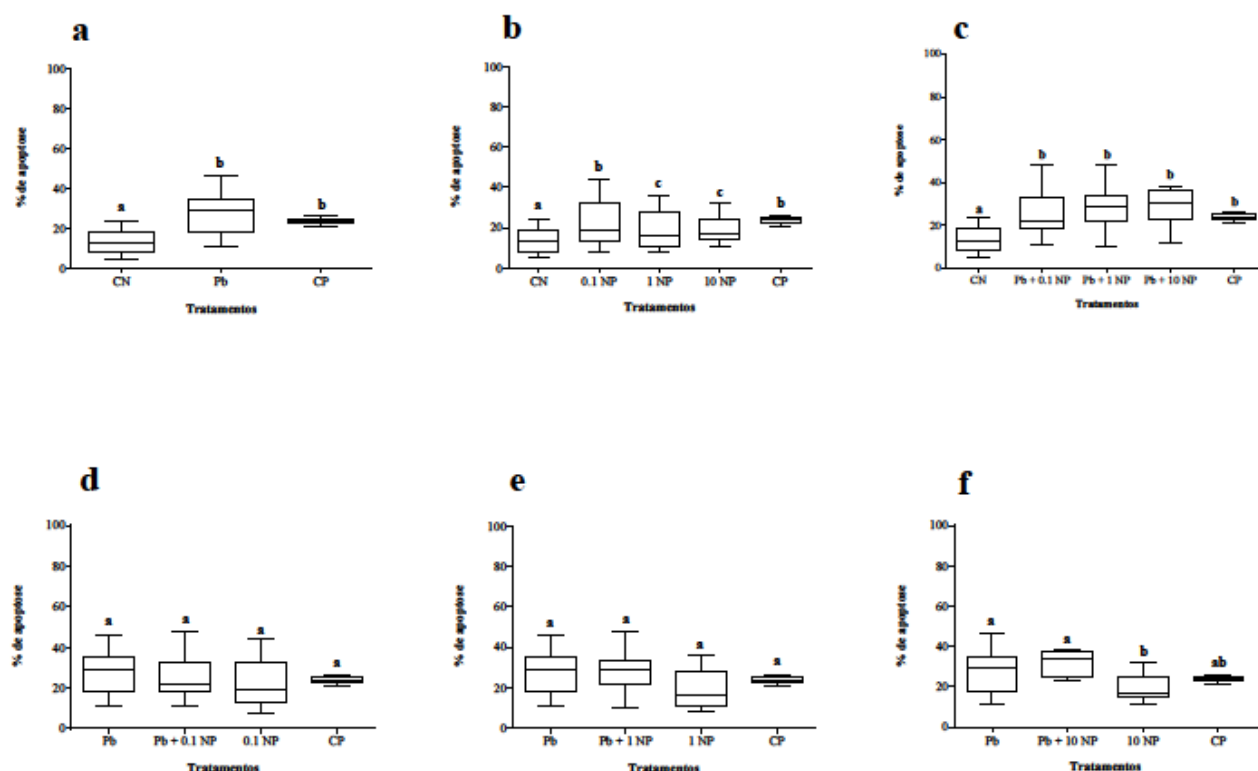
FIGURA 24 - FREQUÊNCIA DE APOPTOSE ENCONTRADA EM ERITRÓCITOS DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS por ensaio de difusão do DNA. Pb: CHUMBO (21 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Pb+0.1 NP), 1 µg/g (Pb+1 NP), 10 µg/g (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.



Ensaio de Difusão do DNA no fígado

Na análise do ensaio de difusão do DNA de células do fígado, novamente o grupo exposto ao chumbo mostrou-se diferente do grupo controle negativo, pois apresentou um aumento na frequência de células em apoptose, comparável ao que foi encontrado no grupo controle positivo (FIGURA 25 – a). No conjunto de análises (b), que avaliou as nanopartículas frente ao controle negativo, todos os grupos expostos às nanopartículas apresentaram diferenças com relação ao controle negativo, porém de formas diferentes (FIGURA 25 – b).

FIGURA 25 - FREQUÊNCIA DE APOPTOSE ENCONTRADA EM CÉLULAS DO FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA. Pb: CHUMBO (21 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE CHUMBO COM NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Pb+0.1 NP), 1 µg/g (Pb+1 NP), 10 µg/g (Pb+10 NP); NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.



O grupo exposto à menor concentração de nanopartículas de TiO_2 (0.1 NP) apresentou a maior frequência de células em apoptose em relação ao grupo controle negativo, porém os

outros dois grupos expostos às nanopartículas (1 NP e 10 NP) também apresentaram um aumento da frequência de apoptose, que não foi tão pronunciada como para o primeiro grupo exposto (0.1 NP). Para o conjunto de análises (c), todos os grupos expostos à associação de contaminantes, apresentaram um aumento da frequência de células em apoptose, quando comparados ao grupo controle negativo, sem diferenças nas frequências entre os grupos (FIGURA 25 – c). Para os conjuntos de análise (d), (e) e (f), que avaliam a frequência de apoptose dos grupos de exposição à combinação de contaminantes em relação aos grupos expostos aos contaminantes de forma isolada, os conjuntos de análise (d) e (e) não apresentaram diferenças [(d) $p=0.7025$ e (e) $p=0.1798$] em relação à frequência de apoptose para os diferentes grupos. O conjunto de análise (f) apresentou diferença significativa para o grupo exposto somente às nanopartículas de TiO_2 (10 NP) em relação ao grupo exposto ao chumbo e ao grupo exposto à associação de contaminantes, pois ocorreu uma diminuição da frequência de apoptose para as células do fígado deste grupo ($p=0.0041$) (FIGURA 25– d, e, f).

DISCUSSÃO

Devido ao aumento do uso de nanopartículas, especialmente em produtos de consumo humano, inevitavelmente essas partículas entrarão no meio ambiente, principalmente no ambiente aquático, destino final de inúmeros compostos produzidos e utilizados pelo homem. A entrada de nanopartículas em organismos aquáticos, incluindo os peixes, já foi demonstrado anteriormente (KASHIWADA, 2006) e isso aumenta a preocupação sobre os efeitos adversos que podem ser causados pelas nanopartículas, tanto na espécie humana, quanto para a biota aquática. Deste modo, a utilização de testes toxicológicos são ferramentas muito úteis para determinar a toxicidade de certos compostos, bem como o efeito ocasionado ao material genético das células, gerando informações que possibilitem a identificação do potencial carcinogênico e consequente proteção da saúde pública e do meio ambiente.

No presente estudo investigou-se o potencial genotóxico e citotóxico das nanopartículas de TiO_2 , bem como sua associação ao íon metálico chumbo, utilizando a espécie *Hoplias intermedius*, popularmente conhecida como traíra (Characiformes, Erythrinidae), como bioindicador. Os peixes do gênero *Hoplias* são carnívoros de água doce, que possuem uma ampla distribuição na América do Sul. Esta espécie foi escolhida como modelo biológico para este estudo, pois devido à voracidade com que ataca suas presas, facilita a exposição trófica a qual foi submetida, além de se adaptar bem as condições

experimentais e ocupar uma alta posição na cadeia alimentar. Além disso, outra espécie deste mesmo gênero, a espécie *H. malabaricus* possui uma grande tolerância à privação alimentar, sobrevivendo por períodos de até 180 dias, sem redução da taxa metabólica (consumo de oxigênio; RIOS *et al.* 2005).

Devido à importância da caracterização das nanopartículas utilizadas antes de cada experimento de toxicidade (MURDOCK *et al.*, 2008), o tamanho das partículas e sua forma, bem como a sua composição e a área de superfície, e do mesmo modo para todas as suspensões, características como o estado de agregação, o índice de polidispersão e o potencial zeta foram determinados com as mais diversas técnicas.

Contudo, uma avaliação da extensão da agregação é crítica, pois um pequeno número de agregados pode, de maneira eficaz, esgotar a concentração disponível de nanomateriais não agregados (e potencialmente tóxicos) de nanopartículas (WISE SR *et al.*, 2010), apesar de já estar descrito na literatura a capacidade de aglomerados de nanopartículas serem internalizados pelas células, por mecanismos diferentes das nanopartículas individualizadas (KETTIGER *et al.*, 2013).

A concentração de chumbo no músculo dos peixes se apresentou abaixo do limite de detecção ($>0,10$ mg/Kg). Uma das razões seria que o principal tecido de distribuição do chumbo não é o músculo, o que pode em parte, explicar a ausência de detecção neste tecido. No entanto, o estudo de Rossi *et al.*, 2014 através da realização de autometalografia, foi possível visualizar a presença de metais distribuídos ao longo do tecido hepático. A concentração de chumbo em peixes oriundos de diferentes ambientes é cerca de cinco vezes mais concentrada no fígado do que no tecido muscular (TURKMEN *et al.*, 2006, 2008; TEPE *et al.*, 2007; DURAL *et al.*, 2007; TAPIA *et al.*, 2006).

Com relação ao uso do metilmetanosulfonato (MMS) como controle positivo, este não foi eficiente para o teste de micronúcleo pisco e alterações morfológicas nucleares. O MMS é um agente alquilante e conhecido pelo seu potencial genotóxico, sendo muito utilizado como controle positivo para análises dos efeitos de poluentes ambientais (FASBBENDER e BRAUNBECK, 2013). A razão pela qual houve uma baixa indução do número de micronúcleos, após uma exposição intraperitoneal de MMS, não é conhecida. Porém, uma explicação poderia estar relacionada a uma elevada taxa de citotoxicidade em 24 horas, impossibilitando a visualização de eritrócitos alterados. Esta falta de indução significativa de micronúcleos foi também observada por Winter *et al.*, (2007) e também por Monteiro *et al.*, (2011), porém ambos utilizaram o composto ciclofosfamida como controle positivo, durante

períodos semelhantes em diferentes espécies de peixes: *Pimephales promelas* e *Prochilodus lineatus*, respectivamente.

Como relatado no parágrafo anterior e por Das e Nanda (1986) e Brunetti *et al.* (1988), a indução de lesões nucleares por agentes genotóxicos pode ser mascarada através de uma ação citotóxica, que mata os eritrócitos em vez de formar lesões celulares não letais, um dos motivos pelos quais possivelmente não foi possível verificar neste trabalho diferenças significativas entre os conjuntos de análise (a), (b) e (c), quando foi utilizado o teste do micronúcleo písceo e de alterações morfológicas nucleares. Para os conjuntos de análise (d), (e) e (f), quando analisamos o total de alterações morfológicas nucleares, observamos que para o conjunto de análise (e) foi possível verificar uma diminuição do número de alterações no grupo exposto à combinação de contaminantes (Pb II+1 NP), em relação aos contaminantes de forma isolada. O aparecimento de lesões nucleares é afetado por uma variedade de fatores, tais como a eritropoiese e o tempo necessário para a maturação e a longevidade dos eritrócitos (UDROIU, 2006). Uma diminuição gradual na frequência de MN com um aumento do período de exposição, bem como a maior concentração dos agentes genotóxicos foi encontrada por Das e Nanda (1986), e explicado por um efeito inibitório sobre a divisão celular e subsequente impedimento na passagem das células afetadas para a circulação periférica (Nepomuceno *et al.*, 1997). Este efeito pode ser resultado tanto da inibição da síntese do DNA (WILLIAMS e METCALFE, 1992) quanto da inibição direta da eritropoiese (DINNEN *et al.*, 1988) causada por vários agentes genotóxicos, em certas concentrações, e considerado como uma propriedade citotóxica dos xenobióticos (UDROIU, 2006). Todos estes fatores devem ser cuidadosamente considerados, pois eles podem ser a base para um falso negativo.

Para as análises das quantidades de micronúcleos, bem como das alterações morfológicas nucleares separadamente, os resultados foram esclarecedores apenas para alguns casos. O grupo exposto ao chumbo, quando avaliado em relação ao controle negativo, apresentou diferenças na análise de micronúcleos, e das alterações do tipo *lobed* e *notched*. As alterações do tipo *lobed* e *notched* também foram encontradas de maneira significativa, em relação ao controle negativo, para o conjunto que analisa as nanopartículas em relação ao controle negativo, e para o conjunto que analisa as co-exposições aos contaminantes, frente ao controle negativo. As alterações do tipo *blebbed* e *vacuolated* apresentaram diferenças para o mesmo conjunto de análise: (e). Porém, a alteração do tipo *binúcleo*, não apresentou diferenças para nenhum dos conjuntos de análise. Informações específicas relacionadas ao mecanismo de formação e mensuração das anormalidades nucleares são escassas, tornando

difícil a comparação dos resultados de diferentes laboratórios. Apesar de algumas divergências, parece ser consensual que os problemas de segregação aliados à união cromossômica ou amplificação gênica por meio de ciclos de quebra-fusão-ponte poderiam causar gomos nucleares (NB) (núcleos *lobed* e *blebbed*) durante a eliminação de DNA amplificado a partir do núcleo (TOLBERT *et al.*, 1992; SHIMIZU *et al.*, 1998, 2000), porém neste estudo, eles não apresentaram o mesmo tipo de resposta, para os mesmos grupos. De acordo com SERRANO-GARCIA e MONTERO-MONTOYA (2001), os fenômenos de brotação dos núcleos celulares e de células bi-nucleadas têm uma origem semelhante com os MN e se supõem ser decorrentes de agentes genotóxicos. Além disso, uma relação positiva e significativa entre MN e indução de núcleos *lobed* e *blebbed* foi encontrada por vários autores (FERRARO *et al.*, 2004; BOLOGNESI *et al.*, 2006; ERGENE *et al.*, 2007; RAMSDORF *et al.*, 2008), sugerindo que a formação de NB nos eritrócitos pode ser útil para uma análise complementar da avaliação da genotoxicidade em peixes. Além disso, segundo HAYASHI *et al.* (1998), o teste do micronúcleo realizado com células de brânquias mostrou-se mais sensível que os eritrócitos, concordando com Çavas, Garanko e Arkhipchuk (2005c) que também relatam sensibilidade maior de células de brânquias e de fígado, em relação às do sistema eritrocitário. Além disso, células circulantes anormais tendem a ser removidas pelo organismo mais rapidamente do que aquelas não danificadas (DAS e NANDA, 1986), informação que foi corroborada pela ocorrência de hemossiderose esplênica concomitantemente com a expressão de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos, como descritos por Pacheco e Santos (2002).

O ensaio cometa é realmente capaz de detectar danos ao DNA causado por diferentes classes de xenobiontes em peixes, atribuindo alta sensibilidade ao teste. Além disso, as concentrações de sítios alcali-lábeis podem variar no DNA de diferentes tecidos e em diferentes espécies animais. Ao fazer o ensaio cometa em diferentes tecidos, as diferenças morfológicas, coloração características, e frequência dos diferentes tipos de células devem ser verificadas. Alguns dos fatores que podem influenciar os danos às fitas do DNA em um determinado tipo celular dos tecidos incluem heterogeneidade, ciclo celular, volume de células ou frequência de células e a cultura de crescimento. Diferentes tipos celulares podem ter níveis muito diferentes antecedentes de danos únicos às fitas de DNA devido à variação na excisão, na atividade de reparação, na atividade metabólica, nas concentrações de antioxidantes, bem como nas concentrações de outros fatores.

Em peixes, o tecido de escolha para a realização do ensaio cometa geralmente é o sangue, pois ele é facilmente coletado, sem a morte do animal, e por que não há a necessidade de dissociação do tecido (KILEMADE *et al.*, 2004). Entretanto, diferentes tecidos podem acumular os metais de diferentes maneiras e intensidades, dependendo das características do mesmo (SUIÇMEZ *et al.*, 2006). Desta forma, a escolha dos tecidos para a realização do ensaio cometa deve levar em consideração à habilidade do tecido em metabolizar os xenobióticos, bem como de ser passível de bioacumulação. Neste ensaio, devido à ausência de estudos envolvendo nanopartículas, via dieta, em peixes, bem como a co-exposição com outros contaminantes possíveis de serem encontrados no ambiente, os tecidos escolhidos foram o sangue, as brânquias, o fígado, o rim e o cérebro, principalmente devido à co-exposição escolhida ser com o metal chumbo.

O ensaio cometa em células do sistema eritrocitário mostrou diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos tratados (conjuntos de análise a, b e c). Para o conjunto de análise a, o chumbo mostrou um aumento dos danos ao material genético, quando avaliamos em relação ao controle negativo. Alguns trabalhos realizados com a espécie *Hoplias malabaricus* através de injeção intraperitoneal (RAMSDORF *et al.*, 2009) e contaminação trófica (FERRARO *et al.* 2004; CESTARI *et al.*, 2004), com o metal chumbo, observaram danos ao DNA relacionados à presença deste metal. Monteiro *et al.* (2011) utilizando o ensaio cometa em eritrócitos, avaliou a exposição hídrica, por 96 horas, da espécie Neotropical *Prochilodus lineatus* ao metal chumbo e observou danos significativos ao DNA, quando comparados ao controle negativo. Segundo estudos de García-Lestón *et al.* (2010), a ação genotóxica do chumbo parece ser indireta, através da inibição do sistema de reparo do DNA e a produção de radicais livres, porém os dados ainda são contraditórios. Para as espécies de peixes neotropicais, apesar das evidências sobre genotoxicidade do chumbo, poucas informações existem acerca do mecanismo de toxicidade para este elemento. Para os conjuntos de análise (b), todas os grupos expostos às nanopartículas de TiO₂ mostraram um aumento de danos ao DNA, com alguns grupos mostrando a ocorrência de danos similares aos verificados pelo controle positivo. O conjunto de análises (c), o grupo exposto ao Pb+ 0,1 NP mostrou um aumento nos danos ao DNA, enquanto que os outros dois grupos de exposição não mostraram diferenças nos danos ao DNA e relação ao controle negativo. Para os conjuntos de análise (d), (e) e (f), que analisam as diferenças entre os grupos expostos aos contaminantes de forma isolada, e a co-exposição aos contaminantes, os conjuntos de análise (d) e (f) não apresentaram diferenças nas respostas, porém o conjunto de análises (e), o grupo exposto aos contaminantes de forma associada (Pb+1NP), mostrou uma diminuição do dano

ao DNA quando comparado aos grupos que foram expostos aos contaminantes de forma isolada. Este resultado corrobora o que foi verificado através do teste do micronúcleo pisco e alterações morfológicas nucleares, no qual o mesmo grupo apresentou uma diminuição do número de alterações encontradas.

O ensaio de difusão do DNA para os eritrócitos, pelo menos até aonde temos conhecimento, ainda não foi utilizado para nenhuma análise *in vivo*, com relação ao aumento de frequência de células em apoptose, após a exposição a qualquer tipo de nanopartícula. A utilização das duas técnicas em conjunto aumenta a confiabilidade da análise, visto que apenas utilizando o ensaio cometa não é possível avaliar as células em apoptose, o que é realizado pelo ensaio de difusão (COLLINS *et al.*, 2007; SINGH, 2000). Neste trabalho, a resposta da contaminação ao metal, seja ele de forma isolada ou associada às nanopartículas de TiO₂ mostrou um aumento da frequência de células em apoptose, algo que foi verificado apenas para as duas maiores doses de nanopartículas utilizadas neste experimento. Quando os conjuntos de análise (d) (e) e (f) foram analisados, os grupos expostos apenas às nanopartículas, nos três conjuntos de análise, mostraram uma diminuição na quantidade de células em apoptose, em contraste ao ensaio cometa do sangue que evidenciou danos ao DNA dos organismos expostos a estes grupos. Esta avaliação nos permite inferir que o mecanismo que está atuando na toxicidade de nanopartículas de TiO₂ não é o mesmo utilizado nos grupos expostos ao chumbo tanto isolados quanto em associação. O chumbo é um metal que pode se ligar e esgotar a glutathione, interferir com o mecanismo de reparo do DNA, ao se ligar a histonas, diminuindo assim a proteção desta molécula. Desta forma, estudos de co-exposição do chumbo com outros compostos podem apresentar efeitos multiplicados, no que diz respeito à indução de quebras em fitas simples do DNA (RANA, 2008).

O ensaio cometa em células das brânquias mostrou diferenças significativas entre os grupos expostos aos contaminantes (conjuntos de análise a, b e c) e o controle. Para o conjunto de análise (a), o chumbo mostrou um aumento dos danos ao material genético, de maneira semelhante aos danos encontrados no controle positivo. Monteiro *et al.* (2011) utilizando o ensaio cometa em células de brânquias, avaliou a exposição hídrica da espécie neotropical *Prochilodus lineatus* ao metal chumbo e observou danos significativos ao DNA destas células, após 24 e 96 horas de exposição, quando comparados ao controle negativo. Para os conjuntos de análise (b) e (c), o resultado mostrou-se semelhante para as duas análises: todos os grupos, quando comparados ao controle negativo mostraram um aumento dos danos ao DNA, tanto os grupos expostos às três concentrações de nanopartículas, quanto os grupos expostos à co-exposição de contaminantes. Federici *et al.* (2007) relatam a

existência de hiperplasia das células epiteliais no filamento primário e na base da lamela secundária, depois da exposição hídrica de *O. mykiss* às nanopartículas de TiO₂. Uma das questões centrais em diferentes estudos com nanopartículas é se o sistema respiratório ou as funções osmorregulatórias das brânquias dos peixes foram comprometidos. As evidências sugerem que os maiores distúrbios osmorregulatórios não estão associados a danos nas brânquias em si, já que a maioria dos autores tem reportado parâmetros hematológicos normais, sem evidências de distúrbios em eritrócitos ou mudanças na concentração de sódio plasmático (FEDERICI *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2007). Em exposições hídricas, os peixes parecem ingerir as nanopartículas durante estes estudos (possivelmente induzidos pelo estresse; SMITH *et al.*, 2007) e a importância deste fenômeno para o funcionamento osmorregulatório entre as brânquias e o intestino, ainda não são conhecidos (HANDY *et al.*, 2011).

Para os conjuntos de análise (d), (e) e (f), que analisam as diferenças entre os grupos expostos aos contaminantes de forma isolada à co-exposição aos contaminantes, todos os conjuntos de análise não apresentaram diferenças nas respostas genotóxicas. Provavelmente, para este tipo de exposição não houve diferença entre os danos observados, pois algum mecanismo envolvendo toxicidade foi capaz de manter os danos ao material genético em um nível muito alto para todos os grupos contaminados, como por exemplo, o mecanismo de estresse oxidativo. No caso de uma exposição trófica (via dieta), o intestino é um importante tecido epitelial, e uma rota em potencial para a entrada dos nanomateriais no organismo. Evidências histológicas sugerem que o epitélio intestinal pode ser danificado pelos nanomateriais, e este dano está relacionado à forma de entrada desses materiais no organismo. Por exemplo, Federici *et al.* (2007), verificou na espécie *O. mykiss*, exposto à uma suspensão de 1 mg/L de nanopartículas de TiO₂, erosão e fusão das vilosidades intestinais, bem como o aparecimento de vacúolos na mucosa intestinal. Claramente, como a maioria das substâncias (HANDY *et al.*, 2005), a precisão da matriz e a quantidade de alimento no lumen intestinal são alguns dos fatores que podem afetar a biodisponibilidade e a toxicidade dos nanomateriais no intestino (HANDY *et al.*, 2011).

Existem inúmeras lacunas acerca do conhecimento relacionando efeitos fisiológicos dos nanomateriais na função intestinal (HANDY *et al.*, 2011). Para este trabalho, informações que seriam de fundamental importância para a discussão dos resultados, não estão disponíveis na literatura, bem como as deficiências nutricionais específicas, causadas pela exposição aos nanomateriais, efeitos nas enzimas digestivas, ou em comunidades microbianas, efeitos no trânsito intestinal, na motilidade e no fluxo sanguíneo. As consequências de quaisquer

disordens na saúde, bem como na imunidade dos peixes, após a exposição aos nanomateriais ainda não tem sido estudadas (HANDY *et al.*, 2011).

Do ponto de vista ecotoxicológico, informações relacionadas à dieta e à taxa de entrada de nanomateriais, a transferência via trófica de nanomateriais e os efeitos crônicos das nanopartículas no crescimento são de interesse fundamental importância. Ramsden *et al.* (2009) não apenas relata a ausência de efeitos no crescimento de *O. mykiss*, com exposições acima de 100 mg/kg de nanopartículas de TiO₂, mas também relata distúrbios bioquímicos e nos marcadores de estresse oxidativos, nos eletrólitos e na bomba de Na⁺ K⁺ ATPase. Ramsden *et al.* (2009) discute ainda que estes efeitos são amplamente similares aos efeitos visualizados em alguns metais, como o Cu e o Cd (CLEARWATER *et al.*, 2002; HANDY *et al.*, 2005).

Estudos realizados em mesocosmos tem demonstrado a transferência de nanomateriais da água para os sedimentos, e para dentro das cadeias alimentares aquáticas (BRADFORD *et al.*, 2009; FERRY *et al.*, 2009), sugerindo que os peixes podem ser expostos, via dieta, às nanopartículas que estão no meio ambiente. Zhu *et al.* (2010) relata a primeira evidência direta da transferência de nanopartículas de TiO₂ das *daphnias* para o peixe *zebrafish*, em uma cadeia alimentar aquática simplificada. Estudos de exposição aos nanomateriais via dieta, ainda não confirmaram se nanopartículas intactas são absorvidas pela barreira epitelial intestinal, em parte por que técnicas para este tipo de análise ainda não estão disponíveis para quantificar a presença de nanomateriais nos tecidos ou por que os níveis de detecção disponíveis são insuficientes para os nanomateriais. Pode ser possível ainda que algumas nanopartículas não sejam absorvidas pelo intestino. Handy *et al.* (2011) relata dados não publicados, nos quais é possível inferir que a taxa de absorção dos nanomateriais estão altamente relacionadas à mesma taxa existente para os metais dissolvidos.

Uma vez que os nanomateriais atravessaram a barreira das brânquias ou do intestino (HANDY *et al.*, 2011), estes terão acesso aos fluidos corporais e ao sistema cardiovascular. Criticamente, o comportamento dos colóides de nanomateriais na circulação, irá determinar como eles são carregados no sangue, e aonde eles serão depositados. Existe uma propensão de estes nanomateriais se agregarem ou se aglomerarem em condições salinas, sugerindo que eles podem aderir aos eritrócitos. Além disso, os nanomateriais possuem uma alta capacidade de adsorver macromoléculas do meio externo, e adquirir uma camada de albuminas ou outras pequenas macromoléculas do sangue por adsorção (formando uma corona de proteínas na superfície dos nanomateriais; HELLSTRAND *et al.*, 2009), mas isto não é um problema incomum com outras substâncias. Como esse processo irá afetar a disponibilidade de

nutrientes e os componentes do sistema imune do sangue, bem como as funções sanguíneas, ainda permanece sem informações concretas.

Ambos, fígado e rim funcionam como órgãos excretores para substâncias exógenas em peixes, e a habilidade desses órgãos em excretar nanomateriais são discutidas no trabalho de Handy *et al.* (2008b). O fígado é o principal local de biotransformação nos animais, e o rim é o principal órgão hematopoiético nos peixes. O fígado pode transformar em compostos prejudiciais alguns metabólitos que são excretados diretamente na bile para continuar a desintoxicação. Quando um composto é excretado na bile, ele posteriormente vai para o intestino.

Desta forma, os resultados encontrados para o ensaio cometa em células do fígado, mostraram a genotoxicidade do metal chumbo no fígado, porém não mostraram efeitos genéticos nas três diferentes concentrações de nanopartículas de TiO₂ utilizadas neste experimento. Monteiro *et al.* (2011) utilizando o ensaio cometa em células de fígado, avaliou a exposição hídrica da espécie neotropical *Prochilodus lineatus* ao metal chumbo e observou danos significativos ao DNA destas células, após 96 horas de exposição, quando comparados ao controle negativo. Ao analisarmos a co-exposição destes contaminantes frente ao controle negativo, apenas o grupo exposto a maior dose de nanopartículas apresentou diferenças com o grupo controle negativo. Nas análises de interação de nanopartículas de TiO₂ com os metais, ocorreu um dano menor nas duas doses mais baixas de nanopartículas de TiO₂, porém os contaminantes em associação não mostraram diferenças com relação ao grupo exposto apenas ao metal chumbo, o que nos mostra algum tipo de interação entre o metal e as nanopartículas. Os estudos sobre o metabolismo e a excreção de nanopartículas manufaturadas são limitados por razões técnicas. Entretanto, é válido considerar se existem razões fundamentais para que estes processos sejam diferentes para nanopartículas manufaturadas em comparação a outras substâncias. Os peixes podem excretar substâncias pelo sangue, através do fígado, rim, brânquias e também através do muco corporal (de origem intracelular). O problema real é se as nanopartículas manufaturadas podem passar através das células do fígado para a bile ou podem ser filtradas pelo rim. A excreção hepática depende de exocitose e do tráfego de vesículas para formar a bile, e levando-se em consideração estas vesículas, que podem ter cerca de 200 nm (HAMPTON *et al.*, 1988), é possível, que pelo menos para partículas primárias com dimensões inferiores a esta, ocorra a entrada nas vesículas (HANDY *et al.*, 2011).

O ensaio de difusão do DNA do tecido hepático mostrou resultados que apoiam os resultados encontrados pelo ensaio cometa nas células hepáticas: aqueles grupos em que foi

encontrado um aumento de danos ao DNA também mostrou uma alta frequência de apoptose. Os grupos expostos às co-exposições dos contaminantes também mostraram um aumento da frequência de células em apoptose, apesar de dois grupos de exposição não apresentarem um aumento aos danos ao DNA. Sabe-se que a exposição ao chumbo inorgânico induz à apoptose nos mais diversos tipos celulares, entre eles, os hepatócitos e células neuronais, provavelmente devido a um papel mitocondrial essencial (RANA, 2008). Com relação à interação entre as nanopartículas de TiO_2 e os grupos de exposição isolada aos contaminantes, o único conjunto de análise que mostrou alguma diferença foi o conjunto (f), cujo grupo 10 NP mostrou uma diminuição da frequência de apoptose em relação aos outros grupos desta análise. Em experimentos *in vivo* que avaliam os efeitos das nanopartículas, a maioria destes utiliza-se do ensaio cometa na tentativa de avaliar a capacidade genotóxica destes compostos (GOLBAMAKI *et al.*, 2015). Pelo menos até aonde temos conhecimento, o ensaio de difusão do DNA ainda não foi utilizado para nenhuma análise com relação ao aumento de frequência de células em apoptose, após a exposição a qualquer tipo de nanopartícula. O uso do ensaio de difusão do DNA para avaliar a apoptose foi revisado por Singh (2005) e sua aplicação em um pequeno número de estudos ambientais tem mostrado resultados promissores (NIGRO *et al.*, 2002; FRENZILLI *et al.*, 2004; DEL BARGA *et al.*, 2006; FRENZILLI *et al.*, 2008; ROCCO *et al.*, 2010).

Em relação ao ensaio cometa para as células do rim posterior, tanto o chumbo quanto as três concentrações de nanopartículas, e as concentrações os contaminantes associados, todos mostraram aumentos nos danos causados ao material genético, quando comparados ao grupo controle negativo, indicando que provavelmente exista alguma rota de excreção destes compostos que está relacionada ao rim. Para a filtração no rim de vertebrados, o peso molecular é de cerca de 60 kDa, e, por conseguinte, parece improvável que nanopartículas maiores do que alguns nanômetros passariam através dos glomérulos. Naturalmente, esta via de excreção não estaria disponível para espécies que não toleram flutuações na salinidade da água, pois estas possuem um rim aglomerular, ou peixes adaptados à água do mar, que produzem pouca ou nenhuma urina no ambiente hiperosmótico. No caso das brânquias, a via de excreção branquial geralmente só se torna importante quando gradientes de difusão para a substância tóxica são revertidos para a direção de saída (por exemplo, colocando-se o peixe em água limpa). Os peixes são conhecidos por não serem capazes de realizar extenso tráfego vesicular da membrana basolateral para a membrana apical das brânquias e assim, por excreção de vesículas nas brânquias, este mecanismo parece pouco provável. Se as junções intercelulares também previnem perdas paracelulares, parece provável que as brânquias terão

um pequeno papel (ou mesmo insignificante) na excreção de nanopartículas manufaturadas. Não foi possível verificar, para o ensaio cometa em células do rim, interações entre os efeitos das nanopartículas de TiO_2 , com os grupos expostos ao chumbo e à co-exposição de contaminantes pois não existiu nenhuma diferença na resposta a este ensaio de nenhum dos contaminantes.

Estudos recentes sugerem que o cérebro pode ser um importante órgão alvo nos estudos de nanomateriais com peixes. Desta forma, o ensaio cometa em tecido cerebral foi um dos escolhidos para realização neste trabalho. Os resultados mostraram efeito do metal chumbo em relação ao controle negativo, além disso, tanto os grupos expostos às nanopartículas de forma isolada, quanto os grupos co-expostos ao metal com as nanopartículas, mostraram aumento dos danos ao DNA em relação ao controle negativo, porém de forma semelhante. Ainda, os conjuntos de análise que avaliam os possíveis efeitos de interação destes contaminantes (d), (e) e (f) não mostraram diferenças nos danos ao DNA para quaisquer grupos, não evidenciando um efeito de interação entre estes compostos. Em um estudo prévio, uma elevada peroxidação lipídica foi relatada no cérebro, porém não em brânquias ou fígado, de exemplares juvenis de *Micropterus salmoides* expostos ao C_{60} (OBERDOSTER, 2004). Mudanças sutis foram verificadas em cérebros de peixes em muitos outros estudos, assim como para mamíferos, fazendo com que houvesse um aumento da preocupação acerca da neurotoxicidade destas nanopartículas. É importante ressaltar que esses dados para os cérebros de peixes, não são baseados em uma detecção quantitativa de nanomateriais no cérebro. Muitos dos efeitos relatados podem ser apenas efeitos de toxicidade secundária, como por exemplo, a hipóxia derivada de danos nas brânquias. A exposição à nanopartículas metálicas também pode causar distúrbios bioquímicos no cérebro de *O. mykiss*, e esses efeitos podem ocorrer tanto por via aquática, quanto por exposições via dieta. Federici *et al.* (2007) observaram uma elevação no ensaio TBARS, o teor de água e flutuações em níveis de Cu, Zn, Mn e K^+ no cérebro de *O. mykiss* expostos a 1 mg/L às nanopartículas de TiO_2 , via hídrica. Em seu estudo de exposição via dieta com TiO_2 , Ramsden *et al.* (2009) relataram flutuações nos níveis no cérebro de Cu e Zn, bem como uma diminuição de 50% na totalidade do cérebro de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase em *O. mykiss* alimentados com nanopartículas de TiO_2 (10 e 100 mg/kg) durante 10 semanas. A elevação da concentração de titânio total nos cérebros destes peixes também foi relatada para confirmar a exposição, embora não estivesse claro se este titânio estava na sua nanoforma ou como íons metálicos.

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é um dos primeiros biomarcadores de exposição reconhecidos como sendo de grande utilidade para os peixes. Além disso, esta enzima tem se

mostrado sensível para alguns metais (FRASCO *et al.*, 2005; RABITTO *et al.*, 2005; PRETTO *et al.*, 2010). Por esta razão, a atividade desta enzima tanto para o cérebro, quanto para o músculo foram mensuradas na tentativa de se verificar se o músculo e/ou o cérebro são tecidos alvo do chumbo e das nanopartículas de TiO_2 e consequentemente afetariam a função desta enzima. O grupo exposto ao metal chumbo não mostrou diferenças na atividade da enzima, para nenhum dos dois tecidos avaliados. Neste caso, pode ser que a concentração de chumbo utilizada neste estudo foi muito baixa para causar a inibição da enzima.

Além disso, a inibição da acetilcolinesterase só acontece em concentrações muito elevadas de metais. As diferenças na inibição da AChE entre os mais diversos metais podem ser explicadas por propriedades tais como o tamanho iônico, o potencial de redução e eletronegatividade (GRIPPO e HEATH, 2003). Para a AChE cerebral, os grupos expostos às três concentrações de nanopartículas mostraram um aumento da atividade desta enzima, do mesmo modo que os grupos expostos à associação dos contaminantes também mostrou este aumento, que foi mais pronunciado, provavelmente devido à presença do metal chumbo. Os conjuntos de análise que avaliam a possível interação entre os contaminantes deste trabalho, mostraram que para os grupos expostos à associação de contaminantes houve um aumento da atividade da enzima em relação aos grupos expostos aos contaminantes de forma isolada, com elevação da atividade da enzima AChE também para os grupos exposto apenas às nanopartículas: 1 NP e 10 NP. Estes dados podem ajudar a entender os resultados do ensaio cometa de cérebro, visto que nesse ensaio ocorreu um aumento dos danos ao material genético deste tecido.

Confirmar a presença de nanomateriais no tecido cerebral pode ser crucial para dados interação, e tal como referido anteriormente, os métodos para medir nanomateriais em tecidos têm de ser desenvolvidos. Embora os estudos acima referidos relatem efeitos biológicos no cérebro de peixes, há poucas evidências que os nanomateriais também estejam presentes no tecido cerebral; e parece provável que a toxicidade secundária, por exemplo, devido à produção de EROs e hipóxia, também pode ocorrer. Embora os dados tenham sido coletados no cérebro dos peixes, as evidências até o momento são favoráveis à captação de um número pequeno ou insignificante de nanomateriais no tecido cerebral. Isto deve ser visto em contexto, uma vez que este é o caso de muitos outros poluentes. No estudo de embriões de peixe por Kashiwada (2006), a fluorescência a partir de nanopartículas de látex foi detectada no cérebro de *O. latipes*, mas apenas em níveis basais. Utilizando um ensaio de hidroperóxidos modificados, Shinohara *et al.* (2009) concluiu que o particionamento dos fulerenos C_{60} para o cérebro de *C. carpio* foi insignificante. Em outros estudos, não ocorreu

um acúmulo significativo de titânio após a exposição hídrica a 1 mg/L de nanopartículas de TiO₂ em *O. mykiss* ao longo de 14 dias (FEDERICI *et al.*, 2007) ou em *O. mykiss* injetados intravenosamente com 100 µg de nanopartículas de TiO₂ (SCOWN *et al.*, 2009)

Os dados encontrados para a AChE muscular mostram que os grupos expostos apenas as nanopartículas não apresentaram diferenças na atividade desta enzima (conjunto de análise b) em relação ao controle negativo, porém quando em associação com o chumbo, apenas o grupo exposto à maior concentração de nanopartículas de TiO₂ mostrou uma inibição desta enzima no músculo. Para os conjuntos de análise que verificam se existe a interação entre os contaminantes deste estudo, para os conjuntos de análise (d) e (f) foi possível verificar a ocorrência deste efeito. O conjunto de análise (e) não mostrou diferenças na atividade da enzima. Estes resultados podem ser explicados, pois pode ser que o músculo não seja um tecido alvo ao chumbo, porém as nanopartículas podem ter sofrido uma interferência do metal e podem ter sido armazenadas no músculo, junto com o chumbo, apenas para uma das concentrações de nanopartículas de TiO₂. Pode ser também que as concentrações de chumbo utilizadas aqui foram muito baixas para causar alguma alteração enzimática, porém quando em associação com as nanopartículas de TiO₂ os efeitos podem ser os mais adversos, visto que pouco se sabe sobre a metabolização das mesmas.

Distúrbios bioquímicos em órgãos internos têm sido relatados em vários estudos, e em particular, o estresse oxidativo aparece de forma recorrente como um mecanismo em potencial de toxicidade das nanopartículas. Os mecanismos de estresse oxidativo, bem como a indução das enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes são bem conhecidos para os metais dissolvidos, como por exemplo, indução pelo Cd da glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) no músculo dos peixes (ALMEIDA *et al.*, 2002) e indução pelo Cu de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (SANCHEZ *et al.*, 2005). Neste trabalho, realizou-se a análise de biomarcadores de estresse oxidativo (SOD, CAT), biomarcadores de transformação (GST, EROD) e biomarcadores de neurotoxicidade (AChE cerebral e muscular). Além disso, também avaliamos a possibilidade de existir danos em macromoléculas (LPO) e a quantificação da enzima metalotioneína (MTs). Com exceção dos biomarcadores de neurotoxicidade que foram realizados no cérebro e no músculo, todas as outras avaliações bioquímicas foram realizadas com o homogenato do fígado da espécie *Hoplias intermedius*.

Neste trabalho, a atividade da SOD mostrou uma diminuição da sua atividade ao grupo exposto ao chumbo e não sofreu alterações de sua atividade nos grupos expostos às três diferentes concentrações de nanopartículas de TiO₂, quando comparados ao grupo controle

negativo. Já a enzima catalase não apresentou modificações para estes dois conjuntos de análise descritos acima (a) e (b). Estes são resultados importantes, uma vez que a SOD, juntamente com a CAT e a GPx, que não foi avaliada neste trabalho, são consideradas a primeira linha de defesa antioxidante enzimática das células. Porém, para o conjunto de análise (c) que avaliou a co-exposição dos contaminantes, um dos grupos de exposição chama a atenção por possuir uma atividade diminuída da SOD e uma atividade aumentada de CAT, o grupo Pb+0,1 NP. Os outros grupos de associação de contaminantes não apresentaram diferenças com relação ao controle negativo para a enzima CAT e para a enzima SOD o grupo Pb+1 NP também mostrou uma diminuição da atividade da SOD, porém não mostrou alterações no nível da CAT. Os outros conjuntos de análise da CAT (d, e, f) não demonstraram diferenças na atividade desta enzima para nenhum dos grupos de análise. Porém a enzima SOD apresentou aumentos em alguns conjuntos de análise que podem estar relacionados a um desbalanço na produção e eliminação das EROs.

O estresse oxidativo foi também verificado em um estudo expondo o peixe japonês *medaka*, às nanopartículas de ferro (LI *et al.*, 2009). Durante este estudo ambos, embriões e peixes adultos verificaram diminuições da enzima superóxido dismutase (SOD), dependentes da concentração dos contaminantes. Em peixes adultos, as diminuições na SOD hepática e cerebral durante os primeiros dias de exposição foram acompanhadas por uma redução da glutathiona (GSH) no cérebro. No entanto, os níveis de SOD e GSH retornaram aos níveis semelhantes ao controle, após 3 dias e não foram observadas diferenças em níveis de malondialdeído (MDA, como um indicador da peroxidação lipídica) no fígado ou no cérebro, durante todo o período de exposição. Isso indica que os peixes adultos foram capazes de se proteger com sucesso contra o estresse oxidativo através da atividade antioxidante, e que foram então capazes de restabelecer a concentração inicial. Já os embriões desta mesma espécie apresentaram uma resposta diferente em relação à exposição às nanopartículas.

Os estudos *in vitro* também mostram evidências de estresse oxidativo de nanopartículas em linhagens celulares de peixes. Reeves *et al.* (2008) em um estudo utilizando células da pele do peixe dourado (GFSk-S1) demonstraram que as nanopartículas de TiO₂, na ausência de foto-ativação, eram capazes de induzir a genotoxicidade, provavelmente como resultado da produção de radicais livres. Vevers e Jha (2008) expuseram a linhagem gonadal de truta arco íris (RTG-2) as nanopartículas de TiO₂ com e sem radiação ultravioleta (UVA) e descobriram que, não houve elevação nos danos ao DNA na ausência de irradiação UVA, porém houve uma redução significativa na integridade lisossomal após 24 h

de exposição, sugerindo que as nanopartículas também foram capazes de danificar as células sem ativação UV.

Existem vários exemplos de contaminantes que podem desregular estruturas de proteínas e funções enzimáticas, sem acoplar aos sítios de ligação de substratos dessas enzimas, como por exemplo, os metais que se ligam em qualquer grupo tiol acessível na estrutura de proteínas (HANDY *et al.*, 2008). Assim, quando os metais estão livres ou presentes em excesso, o seu carácter eletrofílico pode levar a interações com grupos SH de proteínas, que afetam a sua função e desregulam processos importantes como metabolismo de outras substâncias, funções neurais e parâmetros de estresse oxidativo. No entanto, algumas vias metabólicas para as nanopartículas, principalmente aquelas que incluem o metabolismo e a excreção das mesmas, continuam com algumas perguntas a serem respondidas.

Desta forma, neste trabalho, a resposta para os biomarcadores de biotransformação, GST e EROD, mostraram dados que, em sua maioria, já eram esperados, visto a falta de informações acerca destes testes e do metabolismo de nanopartículas de TiO₂. Nenhum aumento significativo na atividade desta enzima foi verificado para os conjuntos de análise (a), (b), (c), (d) e (e). Porém, para o conjunto de análise (f), o grupo exposto à associação dos contaminantes mostrou uma atividade maior desta enzima em relação aos grupos de contaminantes isolados, nos quais foi possível verificar a diminuição da atividade da GST. Para a análise da EROD, não foi possível verificar nenhuma alteração na atividade desta para nenhum dos conjuntos de análise deste estudo. Ainda não é possível saber se as nanopartículas manufaturadas podem ser estericamente disponíveis para se ligarem às enzimas no retículo endoplasmático hepático (ER), de modo que as citocromo mono-oxigenases (CYP) se tornem ativas e possam desagregar esse material (assumindo que as nanopartículas possam acessar o fígado com um todo). De modo a assumir a primeira afirmação como verdadeira e partindo do princípio de que o metabolismo vai trabalhar sobre a superfície das nanopartículas, uma vez associadas ao retículo endoplasmático, as enzimas presentes continuarão, ou não a desagregação dos resíduos de superfície sobre as nanopartículas manufaturadas. Isto pode envolver inicialmente, a adição de grupos funcionais de reações de fase 1, mas, eventualmente, elas podem ser metabolizadas para componentes básicos (por exemplo, CO₂ e água). Além disso, não sabemos se as nanopartículas não interferem com a transferência de elétron para diferentes citocromos envolvidos em as reações de oxidação e de redução. Caso contrário, as reações parariam, ou, alternativamente, poderiam ficar fora de controle (devido ao excesso de elétrons) causando danos às células (HANDY *et al.*, 2008).

Atualmente, os ecotoxicologistas não possuem respostas para qualquer uma dessas perguntas sobre o metabolismo de nanopartículas para os peixes (ou mamíferos), embora algumas tentativas estejam sendo feitas com o intuito de medir a atividade do CYP de algumas espécies (OBERDÖRSTER *et al.*, 2006). Além disso, o metabolismo completo das nanopartículas pode não ser necessário, desde que a partícula seja suficientemente pequena para ser excretada pelo fígado ou rim, e tenha uma superfície hidrofílica funcional que permita com que as partículas se dispersem no plasma sanguíneo, a urina ou na bile.

Quando as defesas antioxidantes são ineficazes em controlar as espécies reativas de oxigênio (EROs), as biomoléculas podem ser danificadas. O fígado de *H. intermedius* possuem defesas antioxidantes robustas que conseguiram evitar o aumento da peroxidação lipídica (LPO) nos grupos de expostos ao chumbo, às nanopartículas de TiO₂ e à associação destes contaminantes. Porém, para os conjuntos que analisam a capacidade de interação destes contaminantes, o conjunto (d) mostrou um aumento da peroxidação lipídica apenas no grupo exposto às nanopartículas de TiO₂ na menor concentração (0,1 NP), enquanto que para os conjuntos de análise (e) e (f), ocorreu um aumento da peroxidação lipídica nos grupos expostos à associação dos contaminantes (Pb+ 1 NP e Pb+10 NP) e no grupo exposto apenas às nanopartículas (1 NP e 10 NP). Alguns nanomateriais também podem causar estresse oxidativo e consequentemente, danos em macromoléculas. Por exemplo, Federici *et al.* (2007) expôs juvenis de truta arco-íris a 1,0 mg/L de nanopartículas de TiO₂ durante 14 dias, o que causou um aumento em substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (ensaio TBARS, um indicador da peroxidação lipídica) na brânquias, fígado e cérebro, juntamente com aumento de glutathione total (GSH) nas brânquias e diminuição da GSH, no fígado. Após a exposição a 50 e 500 µg/L de *quantum dots*, níveis elevados de glutathione oxidada foram observados nas brânquias de *Gasterosteus aculeatus* (SANDERS *et al.*, 2008). Campana *et al.* (2003) após exposição intraperitoneal da espécie *Halobatrachus didactylus* ao metal chumbo na concentração de 100 µL/g, durante 0, 2, 5 e 7 dias verificou uma diminuição progressiva da concentração de MDA no fígado, e a falta de indução no rim, sugerindo que o metal chumbo não é um bom indutor de peroxidação lipídica, o que corrobora com os resultados que foram encontrados neste estudo.

As metalotioneínas são proteínas citosólicas de baixo peso molecular que possuem a habilidade de se ligar aos íons metálicos devido a um grande número de resíduos de cisteína (NORDBERG, 1998). O sequestro de metais pelas metalotioneínas não é um sistema estático, de modo que um aumento na taxa de síntese dessas proteínas é ocasionado por um aumento dos níveis de metais no organismo (HOGSTRAND e HAUX, 1990). Neste estudo, a

concentração de metalotioneínas aumentou para o grupo exposto ao metal chumbo, enquanto que o mesmo aumento não pode ser observado nos grupos expostos às nanopartículas e nem nos grupos expostos à associação de contaminantes. Monteiro *et al.* (2011) após a exposição hídrica da espécie *Prochilodus lineatus* ao metal chumbo durante 6, 24 e 96 horas, verificou um aumento da concentração de metalotioneínas no fígado desta espécie apenas em 6h e 24h, com posterior redução da concentração aos níveis encontrados no controle negativo, em 96h. Campana *et al.* (2003) após exposição intraperitoneal da espécie *Halobatrachus didactylus* ao metal chumbo na concentração de 100 µL/g, durante 0, 2, 5 e 7 dias verificou um aumento da concentração de metalotioneínas no sétimo dia de exposição, mostrando que existe uma relação na resposta observada, pelo menos para o fígado, dependente do tempo necessário para o acúmulo do chumbo no tecido.

Quando analisamos os conjuntos de análise (d), (e) e (f), na tentativa de se verificar se existe uma interação entre o metal chumbo e a exposição às nanopartículas, percebemos uma resposta semelhante para os três conjuntos, na qual os grupos expostos à associação de contaminantes mostraram quantidades de metalotioneínas semelhantes aos grupos expostos apenas às nanopartículas, mostrando que realmente ocorre algum processo de interação entre esses contaminantes, alterando a atividade desta proteína e consequentemente podendo levar a danos de maiores proporções nas células, devido a um desequilíbrio causado pela presença de uma grande quantidade de íons metálicos não imobilizados pelas células. A capacidade de indução das metalotioneínas é maior nos tecidos que estão envolvidos na captação, acúmulo e excreção de contaminantes como fígado, rins, brânquias e intestino. No entanto, suas concentrações podem variar de acordo com a espécie, condições reprodutivas, idade e dieta alimentar (NORDBERG, 1998).

Finalmente, o presente trabalho mostrou os efeitos das nanopartículas de TiO₂, quando expostas isoladas e de maneira associada ao metal chumbo, utilizando uma exposição crônica e trófica, utilizando uma espécie de peixe neotropical *Hoplias intermedius*. Mais estudos se farão necessários a fim de se elucidar as causas de algumas alterações observadas, e para se determinar se existem efeitos diretos das nanopartículas de TiO₂ em tecidos. Os resultados encontrados ajudam a esclarecer os efeitos tóxicos das nanopartículas de TiO₂ em peixes neotropicais, e contribuem para ao desenvolvimento de um banco de dados mais consistente a respeito dos estudos realizados *in vivo*, após a exposição às nanopartículas.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que nanopartículas de TiO_2 aplicadas em baixas doses, utilizando uma exposição crônica via trófica, apresentaram capacidade de alterar atividades enzimáticas, causando danos ao DNA e induzindo apoptose em eritrócitos e no tecido hepático de *Hoplias intermedius*. Além disso, na associação entre nanopartículas de TiO_2 e o nitrato de chumbo, foi possível observar alterações nas respostas de alguns biomarcadores, possivelmente relacionadas ao efeito de uma interação existente entre as nanopartículas e os íons metálicos, que consequentemente apresentou diferentes respostas quando comparada com os grupos tratados somente com o chumbo ou com as nanopartículas de TiO_2 .

A maioria de literatura referente aos efeitos do chumbo em peixes mostra resultados diversos, pois os mecanismos de morte celular não estão completamente elucidados. Além disso, este trabalho teve como importância o estudo de nanopartículas de TiO_2 em baixas doses, pois dados de estudos *in vivo* destas nanopartículas em peixes neotropicais ainda são escassos e muito controversos, devido à complexidade das propriedades físico-químicas das nanopartículas e a dificuldade em se comparar resultados, à fim de encontrar um padrão de resposta à estas nanopartículas.

Os efeitos biológicos de misturas de contaminantes são difíceis de prever, principalmente quando um destes contaminantes são nanopartículas. Por isso, muitos dados conflitantes estão disponíveis na literatura sobre os efeitos combinados das nanopartículas e de outros contaminantes no ambiente aquático, indicando que a co-exposição com as nanopartículas pode tanto aliviar quanto amplificar os efeitos tóxicos de outros compostos. Dessa forma, mais estudos deverão ser realizados, com concentrações ambientalmente relevantes para diferentes nanopartículas, pois resultados inesperados podem ser encontrados, em diferentes níveis da organização biológica.

CAPÍTULO II

Avaliação da toxicidade subcrônica das nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) e quando em associação com o alumínio (Al), na espécie de peixe Neotropical *Hoplias intermedius*, utilizando biomarcadores genéticos e bioquímicos.

Autores: Taynah Vicari, Ana Carolina Dagostim, Helyandra Schicora Gonçalves, Laís Fernanda Oya Silva, Talitha Pires, Letícia da Silva Pereira, Carmen Lúcia Voigt, Helena Cristina Silva de Assis, Marta Margarete Cestari.

Manuscrito em preparação

RESUMO

O rápido desenvolvimento da nanotecnologia e o aumento correspondente no uso de nanomateriais manufaturados em produtos de consumo humano aumentaram a preocupação acerca dos riscos à saúde humana e os impactos ambientais que podem ser causados por esses materiais em nanoescala. As nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) são uns dos nanomateriais mais produzidos e mais utilizados e, por este motivo, são lançados em grandes quantidades no esgoto industrial e urbano, alcançando grandes corpos d'água. Entretanto, devido à alta capacidade de adsorção à metais, e a outros compostos orgânicos, essas nanopartículas podem interagir e alterar os processos de biodisponibilidade, bioconcentração e de toxicidade de outros compostos pré-existentes no ambiente aquático. O metal alumínio é utilizado em um grande número de processos antropogênicos, levando a uma consequente poluição dos ecossistemas aquáticos por este metal. Desta forma, com o intuito de avaliar as nanopartículas de TiO₂, quando expostas sozinhas e em co-exposição ao metal alumínio (Al), utilizamos a espécie de peixe Neotropical de água doce *Hoplias intermedius*, após uma exposição trófica e sub crônica (70 dias). Para tal avaliação, foram utilizados biomarcadores genéticos (ensaio cometa em eritrócitos e ensaio cometa em tecidos, teste do micronúcleo pisco e alterações morfológicas nucleares), biomarcadores de neurotoxicidade (AChE cerebral e muscular), biomarcadores de estresse oxidativo (SOD e CAT), biomarcadores de biotransformação (GST e EROD) e danos em macromoléculas (LPO), bem como a concentração de metalotioneínas (MTs). O presente estudo demonstrou que as nanopartículas de TiO₂ aplicadas em baixas doses, utilizando uma exposição crônica via trófica, apresentaram capacidade de alterar atividades enzimáticas, causando danos ao DNA e induzindo apoptose em eritrócitos e no tecido hepático de *Hoplias intermedius*. Além disso, na associação entre nanopartículas de TiO₂ e o sulfato de alumínio, foi possível observar alterações importantes nas respostas dos biomarcadores, possivelmente relacionadas ao efeito de uma possível interação existente entre as nanopartículas e os íons metálicos, que consequentemente apresentou diferentes respostas quando comparados com os grupos tratados somente com o alumínio ou somente com as nanopartículas de TiO₂.

Palavras chave: nanomateriais; metal, genotoxicidade tecido específica, co-exposição.

INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos são os locais mais importantes de recebimento de esgotos industriais e urbanos, pois, muitas vezes são os destinos finais dos poluentes produzidos por fontes naturais e/ou antropogênicas (HOFFMAN *et al.*, 1995; FLEEGER *et al.*, 2003). Deste modo, um dos objetivos principais da ecotoxicologia é a avaliação dos riscos para os organismos aquáticos e para as populações humanas.

Os nanomateriais geralmente são definidos tendo uma ou mais de suas dimensões externas, internas ou de superfície, dentro da nanoescala (entre 1 e 100 nm). Estes materiais são muito promissores e podem trazer benefícios nas pesquisas médicas, ambientais e de eficiência energética, devido às propriedades muito particulares que estão relacionadas ao tamanho reduzido destes compostos, como por exemplo, uma grande área de superfície e alta reatividade (LANDSIEDEL *et al.*, 2009; CANESI, CIACCI, BALBI, 2015). O aumento da produção e do uso em vários campos, de diferentes tipos de nanomateriais manufaturados (nanopartículas, nanotubos, nanowires e fulerenos e seus derivados), com um crescimento de mercado estimado em mais de meio milhão de toneladas até 2020, inevitavelmente levará a um aumento do despejo, em quantidades significativas, destes compostos no ambiente, principalmente no ambiente aquático (CANESI, CIACCI, BALBI, 2015). Este aumento de produção e consequente aumento no consumo de produtos nos quais a nanotecnologia é aplicada fez crescer a preocupação com os efeitos relacionados à saúde humana e aos impactos ambientais, que precisam ser considerados e balanceados em relação aos benefícios que possam vir a trazer para as populações humanas (COLVIN *et al.*, 2003; EPA, 2007; HANDY *et al.*, 2008a).

A nanopartícula manufaturada de dióxido de titânio (TiO₂) é um dos tipos de nanopartículas mais utilizado hoje (ROBICHAUD *et al.*, 2009; MENARD *et al.*, 2011), principalmente devido às diversas aplicações existentes: cosméticos, tintas de coloração branca, corantes de alimentos e filtros solares. Devido à sua grande capacidade de aplicação e consequente aumento no consumo, essas nanopartículas atingem os corpos d'água em grandes quantidades (MENARD *et al.*, 2011; GONDIKAS *et al.*, 2014). Uma vez no ambiente aquático, essas nanopartículas tanto na coluna d'água, quanto no sedimento, podem se misturar e interagir com outros componentes, não apenas compostos dissolvidos e matéria orgânica particulada, mas também contaminantes hidrofóbicos e íons inorgânicos, incluindo os metais (MAURER-JONES *et al.*, 2013; BAKER *et al.*, 2014; CORSI *et al.*, 2014; GRILLO *et al.*, 2014).

Limbach *et al.* (2007) foi um dos primeiros estudos a postular sobre o que chamou de efeito “cavalo de Tróia” (do inglês *Trojan horse effect*), que seria a entrada facilitada nas células de moléculas tóxicas que estariam adsorvidas às nanopartículas. Baun *et al.* (2008) estendeu esse conceito a um contexto ambiental, recomendando que a avaliação de risco das nanopartículas deveria considerar não apenas a sua toxicidade inerente, mas também considerar possíveis interações com contaminantes que já estariam no ambiente, e que podem levar a mudanças na biodisponibilidade, na bioconcentração e na toxicidade. Com relação à toxicidade de nanopartículas de TiO₂ em peixes, após exposição via dieta em truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*), o único estudo publicado por Ramsden *et al.* (2009), não observou impactos no crescimento ou na nutrição destes animais, porém verificou algumas mudanças nos níveis de Cu e Zn no cérebro, com inibição de 50% da atividade da Na⁺/K⁺ ATPase cerebral. Além disso, foi possível verificar neste trabalho, decréscimo na atividade de TBARS nas brânquias e no intestino, apesar de não terem sido observadas modificações na glutathione total, durante este experimento.

Desta forma, um dos contaminantes que já poderiam estar no ambiente, são os íons metálicos, em especial o alumínio, pois este é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre, atrás apenas do oxigênio e da sílica. Além disso, este metal possui um grande número de aplicações, como a produção de utensílios de cozinha, a embalagem de alimentos e bebidas, a produção de corantes, fermentos e antiácidos, e principalmente, como anticoagulante da matéria orgânica durante o processo de purificação da água (FÉRNANDEZ-DÁVILA *et al.*, 2012). Diversos estudos têm demonstrado que o alumínio é tóxico para a fauna aquática, especialmente para os peixes, nos quais pode acarretar em danos nas brânquias devido à deposição do metal e alterações na osmorregulação, bem como estresse oxidativo em linfócitos (GALAR-MARTÍNEZ *et al.*, 2010; GARCÍA-MEDINA *et al.*, 2010). Em mamíferos, o acúmulo de alumínio no cérebro pode estar relacionado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como Parkinson's, Alzheimer's, esclerose lateral amiotrófica e encefalopatia (FLORA *et al.*, 2003; BONDY *et al.*, 2010). Em peixes, Exley *et al.* (1997) relatou que a histopatologia do cérebro de truta arco íris, expostas ao alumínio mostrou um padrão similar ao cérebro de seres humanos com a doença de Alzheimer. A patologia de animais em laboratório expostos ao alumínio mostrou muitos indicativos de estresse oxidativo, incluindo mudanças nos níveis de enzimas antioxidantes e a ocorrência de lesões por estresse oxidativo (ZATTA *et al.*, 2002).

Um aumento do número de evidências sugere que em diferentes sistemas biológicos, interações das nanopartículas de TiO₂ com outros fatores físicos/ químicos podem resultar em

um aumento de toxicidade e de efeitos adversos, o que causa uma preocupação ainda maior sobre a ecotoxicidade e toxicidade relacionados ao meio ambiente aquático, bem como aos seres humanos (Liu et al., 2013). Com relação aos possíveis efeitos de interação das nanopartículas de TiO_2 e dos metais, o exemplo mais estudado é a co-exposição das nanopartículas de TiO_2 e o metal cádmio (Cd^{2+}): estes estudos mostram que a biodisponibilidade, bioacumulação e toxicidade pode ser afetada pela presença de nanopartículas de TiO_2 , em concentrações de mg/L. Em carpas e em *zebrafish*, uma potencialização do processo de bioacumulação do cádmio foi verificada, quando este metal foi exposto com as nanopartículas de TiO_2 (ZHANG *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2012). De modo geral, embora a literatura disponível indique mudanças na biodisponibilidade, no *uptake*, na bioacumulação do Cd^{2+} , na presença de nanopartículas de TiO_2 , provavelmente devido à sorção do metal às nanopartículas em meio aquático, nenhuma evidência sobre o aumento de toxicidade foi relatada (CANESI, CIACCI, BALBI, 2015).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar, utilizando biomarcadores bioquímicos e genéticos, os efeitos das nanopartículas de dióxido de titânio e do alumínio, quando utilizados em associação, a fim de se verificar se existem efeitos alterados, relacionados ao uso concomitante desses contaminantes. Os efeitos biológicos das misturas de contaminantes são difíceis de prever (CANESI, CIACCI, BALBI, 2015) e ainda mais desafiadores quando um desses contaminantes é uma nanopartícula, devido às propriedades particulares destas substâncias e seu comportamento imprevisível em condições similares às ambientais. Para evitar um novo desastre ambiental, não muito diferente do que foi visto com o DDT e com as bifenilas policloradas (PCBs) em organismos de vários níveis tróficos, o potencial de transferência das nanopartículas e de outros compostos que possam estar a ela adsorvidos e as consequências ecológicas associadas a essas nanopartículas, devem ser investigadas. Desse modo, a utilização de uma exposição trófica é de fundamental importância para a geração de informações a respeito das nanopartículas, principalmente em peixes Neotropicais, para os quais o banco de dados é ainda mais escasso. Este tipo de abordagem experimental tem por principal motivo imitar uma condição encontrada em ecossistemas naturais de água doce, aumentando o nosso conhecimento sobre a espécie e interesse e a toxicidade das nanopartículas de TiO_2 e do alumínio. Este tipo de experimento já foi utilizado, com sucesso, em outros estudos (FERRARO *et al.*, 2004; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2006; MELA *et al.*, 2007; VICARI *et al.*, 2009).

MATERIAL E MÉTODOS

Organismo teste

A família, que ocorre em quase todas as bacias hidrográficas das Américas Central e Sul, desde a Costa Rica até a Argentina, é composta por três gêneros: *Erythrinus*, *Hoplerythrinus* e *Hoplias*. A espécie *Hoplias intermedius* (popularmente conhecido como trairão) (Characiformes, ERYTHRINIDAE), endêmica da América do Sul, foi escolhida como organismo teste para a realização deste estudo. Peixes desta família caracterizam-se por possuir o corpo cilíndrico, nadadeira caudal arredondada e pela ausência de nadadeira adiposa (OYAKAWA e MATTOX, 2009). Podem atingir até um metro de comprimento e ter entre 15-20 kg de peso corporal (BRITSKI, 1972). Estes peixes possuem preferência por ambientes lóticos (OYAKAWA e MATTOX, 2009), ambientes nos quais predam outros peixes por serem essencialmente carnívoros. Em muitas regiões da América do Sul, estes peixes são importantes na pesca comercial, mas principalmente na pesca de subsistência.

Os exemplares foram obtidos da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de FURNAS, São José do Rio da Barra, sul do estado de Minas Gerais - Brasil. A piscicultura não apresenta contaminação ou fontes capazes de fazê-lo. Os peixes foram aclimatados durante aproximadamente 40 dias em tanques de 250 litros com aeração, fotoperíodo controlado (12h claro/ 12h escuro) e alimentação diária. Este gênero tem a vantagem de ser facilmente alimentado em condições de laboratoriais e em bioensaios, porque ele devora a sua presa inteira, facilitando assim a contaminação com qualquer contaminante de interesse, por via trófica (FERRARO *et al.*, 2004). Depois de decorridos os 40 dias de aclimação, os peixes foram distribuídos em uma densidade populacional de um peixe em cada aquário de 20 litros contendo água de - clorada, mantidos a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, com o pH 7.2, aeração constante e foto período de 12h claro/ 12h escuro e a partir deste período, os peixes passaram a ser alimentados a cada 5 dias, com um exemplar de *Astyanax* sp.

Preparo de soluções e suspensões

As nanopartículas de dióxido de titânio (marca Sigma-Aldrich® - *Titanium (IV) oxide nanopowder*, 21 nm *particle size* (TEM), $\geq 99.5\%$ trace metal basis) foram adquiridas na forma de pó de coloração branca. As três suspensões de nanopartículas de TiO_2 foram confeccionadas do mesmo modo (adicionando-se o pó em água ultrapura) nas concentrações

de 0.01 mg/L ; 0.1 mg/L e 1 mg/L. As suspensões foram então sonicadas por 6 horas em banho-maria ultrassônico (marca Schuster[®], modelo: L-100), com uma frequência de 42 khz e, antes de serem utilizadas nos ciclos de contaminação, foram novamente sonicadas por 30 minutos cada uma, utilizando a sonda sonicadora (marca: Sonics[®]; modelo: VCX130PB), em uma frequência de 20 khz e amplitude de 80%.

As concentrações das suspensões de nanopartículas foram escolhidas baseadas no artigo de Zhu *et al.* (2010). Neste trabalho, os autores recriam em um bioensaio, utilizando condições de exposição trófica entre a espécie *Daphnia magna* e o peixe zebra (*Danio rerio*), expondo as daphnias a concentrações de 0.1 mg/L e 1 mg/L. Devido à falta de informações relacionadas a este tipo de exposição, decidimos ainda utilizar um terceiro valor, 10 vezes abaixo do menor valor, finalizando os experimentos com 3 suspensões de nanopartículas de dióxido de titânio.

Para o processo de caracterização das nanopartículas foram utilizadas as imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), bem como a difração de raios-X para confirmar a estrutura cristalina do nanomaterial fornecida pelo vendedor. Para os cálculos da área de superfície específica, o porosímetro Quantachrome[®] foi utilizado e através do método descrito por Brunauer Emmett Teller (Teoria da Adsorção Multimolecular – método B.E.T.), foi realizada, adicionalmente, a análise da porosidade da superfície das nanopartículas. A técnica de XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy) foi também utilizada para uma análise mais detalhada da estrutura química de superfície das nanopartículas.

A caracterização da suspensão de nanopartícula foi realizada através do aparelho Zetasizer[®] Nano Series ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) no qual se verificou o tamanho médio das partículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta das mesmas. As medidas foram realizadas a 25°C. Para análise de tamanho das partículas e índice de polidispersão utilizou-se cubeta de poliestireno. Cada análise durou em média 105s e foi obtida com um ângulo de detecção de 90° e laser vermelho 633nm. Para determinar o potencial zeta, as amostras foram colocadas em célula eletroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido, realizando em média 12 corridas para cada amostra. Através do índice de polidispersão foi possível calcular a porcentagem (%) de polidispersão [% Polidispersão (%Pd) = $(\text{PdI})^{1/2} \times 100$], para verificar a homogeneidade de tamanhos de partículas presentes na suspensão coloidal, sendo considerada como suspensão homogênea quando %Pd < 20 (MALVERN, 2005).

O alumínio, na sua forma $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (CAS number: 10043-01-3) foi utilizado na concentração de 50 μg de Al/ g de peixe. Este valor foi escolhido, pois outros trabalhos já

realizados em nosso laboratório, em espécies Neotropicais mostraram bons resultados com esta dose (dados não publicados). Além disso, o valor entre 30 mg e 50 mg são considerados valores referência de conteúdo de alumínio total que podem ser encontrados em seres humanos (ALFREY, 1980).

Desenho experimental

Decorrido o período de aclimação, o bioensaio terá início. Os trairões serão expostos aos xenobiontes por via alimentar, por uma exposição trófica. As presas são exemplares do gênero *Astyanax* sp., que serão previamente contaminados com uma injeção intraperitoneal com os contaminantes (FIGURA 26), ou água destilada no caso do controle negativo.

FIGURA 13 - PRESA (*Astyanax* sp.) DE *Hoplias intermedius* RECEBENDO A INJEÇÃO DO CONTAMINANTE RELATIVO AO PESO DO PEIXE PREDADOR



Fonte: A autora (2015)

No total, existem 5 grupos de exposição: um grupo que foi contaminado apenas com as nanopartículas de dióxido de titânio, outro grupo que foi contaminado apenas com o sulfato de alumínio, e um terceiro grupo, cuja presa recebeu duas injeções, sequenciais, de nanopartícula de dióxido de titânio e de alumínio. O quarto grupo é o grupo controle negativo e, neste caso, a presa recebeu uma injeção de água destilada. O quinto grupo é o grupo controle positivo, porém neste grupo foi injetado no trairão (*Hoplias intermedius*), 5 µg de MMS/ g do peso do animal, apenas 24 horas antes do término do experimento, de forma que todos os grupos de exposição foram mantidos sob as mesmas condições de aeração e fotoperíodo, durante 70 dias de experimento e 14 ciclos de alimentação. Cada peixe é

considerado como exposto ao contaminante após ingerir a presa por completo (FIGURA 27). Após as injeções, as presas eram destinadas aos seus respectivos aquários.

FIGURA 14 - EXEMPLAR DE *Hoplias intermedius* SENDO ALIMENTADO DURANTE O PROCESSO DE EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES.



Fonte: Tatiane Klingelfus (2015)

O volume da solução de metal injetado em cada presa, bem como o volume injetado das suspensões de nanopartículas de dióxido de titânio e de água destilada foi ajustado de acordo com os pesos individuais de cada um dos peixes que receberiam as presas, para alcançar as doses de: 50 µg de Al/ g do peso do animal; e para as nanopartículas as doses de 0.1 µg/g, 1 µg/g e 10 µg/g do peso do animal. Após 70 dias do início da contaminação, contendo 14 ciclos de alimentação, a cada 96 horas, deu-se início à coleta das amostras.

Para a obtenção das amostras, os exemplares de *H. intermedius* foram anestesiados com benzocaína (Merck®, Darmstadt, Germany) diluída em etanol a 10%, em uma concentração de 10 mg/L, e em seguida, sacrificados através de secção medular, e posteriormente pesados, medidos e sexados (CABRAL GONTIJO *et al.*, 2003).

Com o auxílio de uma seringa e agulha heparinizada, o sangue periférico foi extraído através da veia caudal, em seguida foi confeccionada uma lâmina de esfregaço sanguíneo para o Teste de Micronúcleo Písceo e o restante da amostra de sangue foi coletado em microtubos do tipo Eppendorf[®], contendo 1,0 mL de soro bovino fetal e armazenados sob-refrigeração e na ausência de luz. Imediatamente após serem sacrificados por uma secção medular, com o auxílio de tesoura e pinças, foram retiradas amostras dos tecidos branquial, hepático, renal e cerebral e em seguida, colocadas em microtubos do tipo Eppendorf[®], contendo 500 µL de soro bovino fetal e guardados sob-refrigeração para posterior realização do Ensaio Cometa. Procedeu-se também a retirada dos órgãos de interesse (fígado, cérebro e músculo) para a confecção das análises bioquímicas. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer - 80° C até a preparação das amostras.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioensaios pertencente ao Laboratório de Mutagênese Ambiental do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (FIGURA 29). O experimento realizado foi aprovado pela Comissão de ética para Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), sob o certificado de número 791.

Concentração do metal no tecido muscular.

Para a análise de bioconcentração de alumínio (Al) *pools* de músculo (0,5 g) de todos os peixes expostos ao alumínio, alumínio associado às nanopartículas, bem como do grupo controle negativo, foram digeridos em ácido nítrico (65%) e peróxido de hidrogênio (30%), sob aquecimento (90-95° C, por aproximadamente 30 minutos), para aceleração do processo de digestão. A concentração de Al foi aferida nas amostras digeridas por espectrofotometria de emissão ótica por plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP-OES), pelo Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (CEPPA-UFPR).

Biomarcadores bioquímicos

Preparação das amostras

Assim que foram retiradas do congelamento, as amostras foram preparadas como a seguir:

Um fragmento de cérebro (\pm 50 mg) e do músculo axial (\pm 100 mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,5), numa proporção 1:10 (peso: volume). Em seguida o homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 20 minutos à 4 °C. O

sobrenadante foi aliqotado para a análise da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no músculo e no cérebro, respectivamente.

Uma porção (± 100 mg) de cada amostra de fígado foi homogeneizada em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7), numa proporção de 1:10 (peso:volume) e centrifugadas à 15.000 xg por 30 minutos, à 4 °C. O sobrenadante foi aliqotado para a análise das atividades das enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione - S-transferase (GST), etoxiresorufina – O - deetilase (EROD) e do nível de peroxidação lipídica (LPO).

Outra porção (± 80 mg) de cada amostra de fígado foi homogeneizada em tampão Tris-HCl/ Sacarose (20 mM/ 500 mM, pH 8,6), numa proporção de 1:5 (peso:volume), centrifugada a 15.000 x g por 30 minutos à 4 °C, e o sobrenadante foi aliqotado para a quantificação de metalotioneínas (MTs).

Atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE, tanto cerebral quanto muscular, foi medida segundo método de Ellman *et al.* (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998), e consiste no desenvolvimento de uma reação colorimétrica entre o ATC (iodeto de acetiltiocolina) e o DTNB (5,5-Ditio-bis-2-nitro-benzoato) na presença de acetilcolinesterase, que pode ser mensurada por espectrofotometria a 405 nm. Para tanto as amostras foram diluídas para 800 μg de proteína. mL^{-1} em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,5). Em microplaca, foram pipetados 50 μL de amostra, 200 μL de DTNB (0,75 mM) e 50 μL de ATC (9 mM), respectivamente. A leitura da atividade foi feita por 3 minutos em intervalos de 15 segundos, e a mesma foi expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

Atividade das Glutathione S transferases (GSTs)

A atividade da GST foi medida segundo o método descrito por Keen, Habig e Jakoby (1976), baseado na catalisação da reação de conjugação do CDNB (1-cloro- 2,4-dinitrobenzeno) com a glutathione reduzida (GSH), pela GST, formando um tio éter, que pode ser medido pelo aumento da absorbância a 340 nm. Os sobrenadantes de fígado foram diluídos para 2 mg de proteína. mL^{-1} . Em microplaca foram adicionados 20 μL de amostra, seguido de 180 μL de solução reação [GSH (3mM), CDNB (3 mM), tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 6,5)]. A medida da absorbância foi feita a cada 15 segundos, durante 3 minutos, e a atividade foi expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

Etoxiresorufina O-deetilase (EROD)

A análise da EROD foi realizada segundo o método descrito por Burke e Mayer (1974), a partir da determinação por espectrofluorimetria, a 530 nm de excitação e 590 nm de emissão, da resorufina resultante da metabolização da 7-etoxiresorufina pela EROD. Em microplaca, de fundo e paredes pretas, foram adicionados: a amostra, uma solução de 7-etoxiresorufina (2,6 μM), e a microplaca permaneceu incubada por 5 minutos, em seguida foi adicionada a solução contendo o cofator NADPH (2,6 mM). Imediatamente a fluorescência foi mensurada, a cada 1 minuto, por 10 minutos. A atividade foi expressa em fmol de resorufina.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Para a análise da atividade da SOD no fígado, foi utilizado o método proposto por Gao *et al.*(1998), que se baseia na capacidade da SOD em inibir a autooxidação do pirogalol. O sobrenadante foi diluído de 1:10 (ou 10% V/V) em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0). Em microtubos do tipo Eppendorf[®], foram adicionados 885 μL de tampão Tris/EDTA (1 M/ 5mM, pH 8,0) e 50 μL de pirogalol (15 mM) em 40 μL de amostra. A solução foi incubada posteriormente por 30 minutos. A reação foi interrompida com 25 μL de HCl 1N. Em microplaca foram adicionados 300 μL por poço e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 440 nm. Ao mesmo tempo, foi realizado um controle por amostra com adição dos reagentes, mas sem incubação, sendo este valor igual a 100%. A quantidade de SOD que inibi a reação de auto-oxidação do pirogalol em 50% (IC50) equivale a 1 unidade (U) de SOD. A atividade foi expressa em U de SOD. mg de proteína⁻¹.

Atividade da Catalase (CAT)

Para medir a atividade da CAT hepática foi utilizado o método de Aebi (1984), que está baseado no consumo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) exógeno pela CAT, gerando água e oxigênio, podendo ser mensurado por espectrofotometria a 240 nm. As amostras foram diluídas (1:5) e como substrato foi utilizado uma solução de H₂O₂ (20 mM). Em microplaca foram adicionados 5 μL da amostra e 295 μL da solução de peróxido de hidrogênio. A leitura da absorbância foi realizada a cada 15 segundos durante 1 minuto e a atividade foi expressa em $\mu\text{mol.min}^{-1}$.mg de proteína⁻¹.

Nível de Lipoperoxidação (LPO)

A análise da LPO foi feita através da avaliação da concentração de hidroperóxidos pelo ensaio FOX (JIANG *et al.*, 1992), com leitura em espectrofotômetro, em 570 nm. O método consiste na oxidação do ferro, mediada pela presença de peróxidos em meio ácido. Para tanto, os sobrenadantes foram diluídos em metanol (1:2 v/v) e centrifugados. Então, 100 µL do sobrenadante foram incubados por 30 minutos com 900 µL da solução reação contendo laranja de xilenol (0,1 mM), BHT (4 mM), sulfato ferroso amoniacal (2,5 mM) e ácido sulfúrico (25 mM), diluídos em metanol. A unidade de concentração de peróxidos lipídicos usada foi nmol. mg de proteína⁻¹.

Metalotioneínas (MT)

Para a avaliação do conteúdo de metalotioneínas foi utilizado o método proposto por Viarengo *et al.* (1997), com algumas modificações. Este método determina o conteúdo de sulfidrila (presentes nas MTs) a partir da comparação com uma curva de GSH, através da determinação da absorbância a 412 nm, considerando 30% como a porcentagem de cisteínas que correspondem à metalotioneínas. Para tanto foi realizada uma série de precipitações, centrifugações e ressuspensões, culminado na ressuspensão do pellet contendo metalotioneínas, ao qual foi adicionada a solução de *Ellman*, contendo: DTNB (0,4 mM) em tampão fosfato de sódio/NaCl (0,2 M/ 2 M, pH 8). A unidade de concentração de metalotioneínas usada foi µg MT. mg de proteína⁻¹.

Biomarcadores genéticos

Teste do Micronúcleo Písceo e alterações morfológicas nucleares

Para avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade foi empregado o Teste de Micronúcleo Písceo aplicando a metodologia descrita por Vicari *et al.*, 2012. Após a coleta do sangue do animal, uma gota de sangue é colocada em uma lâmina limpa e com o auxílio de uma lamínula foi realizada a técnica do esfregaço sanguíneo. Após um período de secagem *overnight*, as lâminas foram fixadas etanol absoluto por 25 minutos. Posteriormente as lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 6,8) por 15 minutos; lavadas em água corrente e após novo período de secagem *overnight*, foram analisadas em microscópio óptico (aumento de 1000x – Olympus CX 40). Através de análise cega, foram analisadas 2000 células por lâmina observando à presença de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares.

Para as análises foram consideradas apenas hemácias nucleadas e com membrana nuclear e citoplasmática intactas. Os critérios para a identificação de eritrócitos micronucleados foram:

- a) O micronúcleo não pode ultrapassar um terço do tamanho do núcleo principal.
- b) O micronúcleo deve estar claramente separado do núcleo e ter a mesma refração do núcleo principal.

As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadraram no conceito de micronúcleo, também foram analisadas, sendo descritas como alterações morfológicas nucleares, como descritas por Carrasco *et al* (1990) e como citado por Ayllon e Garcia-Vazquez (2001).

Ensaio Cometa

A técnica utilizada para o ensaio cometa foi a descrita por Singh *et al.* (1988) com modificações segundo Ferraro *et al.* (2004), para a confecção de lâminas com eritrócitos e segundo Ramsdorf *et al.* (2009), para os tecidos renal, hepático, branquial e cerebral.

Ensaio cometa em eritrócitos

Para montagem e análise das lâminas foram coletados 10 µL de sangue de cada animal e diluído em 1,5 mL de soro bovino fetal. Desta solução, foram coletados 10 µL de suspensão celular e misturado com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP - 0.5% - Gibco®), levemente aquecida. A suspensão celular foi então colocada sobre uma lâmina com a cobertura de agarose normal (NMP - 0.75% - Gibco®) previamente confeccionada, e posteriormente, coberta com uma lamínula e levada a geladeira por 15 minutos. Decorrido o tempo de refrigeração, as lamínulas foram retiradas e colocadas em solução de lise à 4 °C, na qual foram mantidas por 24 horas.

A corrida eletroforética foi realizada a 4 °C no escuro, com a adição de um tampão alcalino (pH >13), de maneira a cobrir as lâminas que foram mantidas horizontalmente na solução por 30 minutos para permitir a desespiralização do DNA. A corrida foi realizada a 25 V e 300 mA, por 25 minutos. Após o término da eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em três lavagens com 5 mL de tampão de neutralização (0.4 M Tris, pH 7.5) cada uma, com 5 minutos cada sessão. As lâminas foram então secas, fixadas com etanol absoluto por 5 minutos e posteriormente analisadas.

Para a análise, cada lâmina foi corada com 20 µL de brometo de etídeo (20 mg/L-Sigma-Aldrich®) e analisada imediatamente em microscópio de epifluorescência (aumento de 400 x - marca Leica® - modelo DFC300).

Ensaio cometa em tecidos

O procedimento para montagem das lâminas iniciou após a retirada dos tecidos (brânquia, fígado, rim e cérebro) de cada exemplar, sendo acondicionados em microtubos do tipo Eppendorf® contendo 500 µL de soro bovino fetal e armazenados sob-refrigeração e ausência de luz. Os tecidos foram desagregados em micro homogeneizador (Tecnal®, modelo TE-103) a 1500 rpm por cerca de 30 segundos. Posteriormente, foram coletados 20 µL do homogenato obtido e este foi misturado com 120 µL de agarose LMP, levemente aquecida (37 °C), para a montagem das lâminas. O restante do procedimento prossegue-se de forma semelhante ao ensaio cometa com eritrócitos.

Foram analisados 100 nucleóides para cada lâmina, de cada peixe. Os danos foram categorizados visualmente, segundo (COLLINS *et. al.*, 1997), levando-se em consideração a relação do comprimento da cauda em relação à ‘cabeça’ do cometa, sendo considerado: dano 0 (sem danos aparentes), dano 1 (pouco dano), dano 2 (dano moderado), dano 3 (dano elevado) e dano 4 (dano máximo). Os cometas em que não foi possível visualizar a região da cabeça foram desconsiderados da contagem por representarem material genético totalmente fragmentado, característico de células inviáveis. Os escores foram atribuídos através da multiplicação do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo número da classe.

Ensaio de difusão do DNA

O ensaio de difusão do DNA avaliou a frequência de células apoptóticas e necróticas segundo método descrito por Singh (2000) baseado no mesmo protocolo descrito acima para o ensaio cometa, com a omissão da etapa da eletroforese. Foram contabilizados 100 nucleóides e separados em células normais, em processo de apoptose em processo de necrose.

Análise estatística

Na análise estatística os tratamentos foram separados em seis grupos: **(a)** Controle, Al e controle positivo, quando houver; **(b)** Controle, 0,1 NP, 1 NP, 10NP e controle positivo, quando houver; **(c)** Controle, Al +0,1 NP, Al +1 NP, Al + 10NP e controle positivo, quando houver; **(d)** Al, Al +0,1 NP, 0,1 NP e controle positivo, quando houver; **(e)** Al, Al +1 NP, 1

NP e controle positivo; (f) Al, Al +10 NP, 10 NP e controle positivo. Esta separação evita a análise de grupos que não possuem relevância biológica de forma conjunta, evitando assim erros estatísticos.

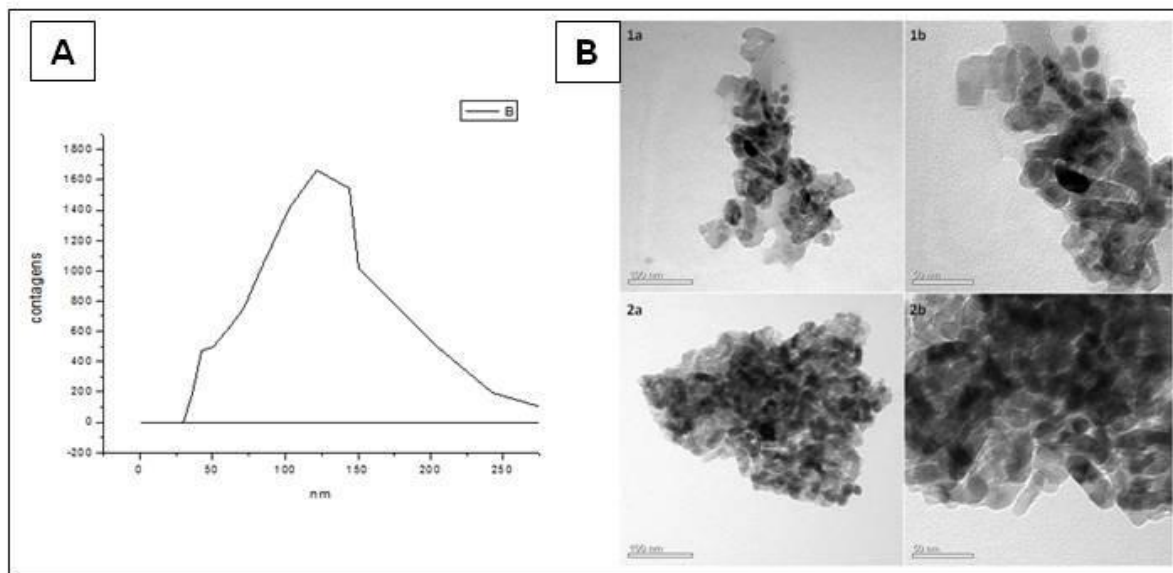
Em todos os grupos foi analisada a normalidade dos dados através do teste de Kolmogorov-Smirnov, para determinar a utilização de teste paramétrico ou não paramétrico. Caso os dados possuíssem uma distribuição normal, foi utilizado o teste ANOVA (1 critério) seguido do pós-teste T (LSD). Caso os dados não possuíssem uma distribuição normal ou apresentassem variâncias desiguais, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, com pós teste de Student-Newman-Keuls, a fim de verificar as possíveis diferenças entre os grupos expostos e grupos controle positivo e negativo, com um nível de significância menor que 0,05 ($p < 0,05$). Para tais análises e gráficos, foram utilizados os programas GraphPad® Prism e BioEstat.

RESULTADOS

Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio

As estruturas cristalinas que compunham as nanopartículas de TiO_2 eram 100% do tipo anatase, constituídas de 28,42% de titânio e 71,58% de oxigênio e apresentando uma dimensão média de 45 nm e 107 nm para as partículas agregadas. A análise pelo método B.E.T. mostrou uma área de superfície específica das nanopartículas de $83.47 \text{ m}^2/\text{g}$. Através da microscopia eletrônica de transmissão foi obtida a estrutura morfológica das nanopartículas de dióxido de titânio em pó (FIGURA 28).

FIGURA 15 - CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE DIÓXIDO DE TITÂNIO. (A) GRÁFICO COM INFORMAÇÕES SOBRE O TAMANHO MÉDIO DAS NANOPARTÍCULAS DE TiO_2 EM PÓ. (B) ELETROMICROGRAFIAS DAS NANOPARTÍCULAS DE TiO_2 : “1a” E “2a” EM ESCALA DE 100 nm E EM “1b” e “2b” EM ESCALA DE 50 nm.



A caracterização das três diferentes concentrações de nanopartículas de TiO_2 foi realizada através do aparelho Zeta Sizer[®]. As mensurações realizadas pelo aparelho demonstraram que as suspensões apresentaram características físico-químicas diferentes uma da outra (TABELA 5). A suspensão de concentração 0,01 mg/mL apresentou partículas de tamanho entre 150 nm e 350 nm, com o tamanho médio sendo de 234.40 nm, tamanho este que concentra o maior número de partículas (FIGURA 29). O valor do potencial zeta calculado para esta suspensão é de -15.5 mV e por este motivo é considerada uma suspensão instável. Esta instabilidade provavelmente está relacionada à força entre as partículas, que promoveu uma agregação entre elas. Ao analisarmos o valor calculado para a porcentagem de polidispersão, podemos avaliar que esta suspensão é considerada heterogênea, pois o valor calculado mostra a porcentagem como sendo maior do que 20%, valor crítico para as suspensões de nanopartículas.

Já para a suspensão de 0,1 mg/mL apresentou um tamanho de partículas ainda maior, entre 250 nm e 700 nm, com o tamanho médio das partículas sendo 425.8 nm (FIGURA 29). O valor do potencial zeta calculado para esta suspensão foi de +14.1 mV e por este valor, esta suspensão também é considerada instável. Com relação à porcentagem de polidispersão, o

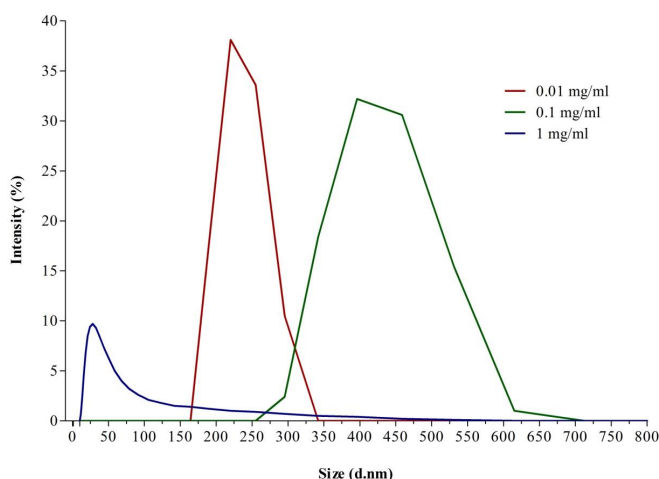
valor calculado para esta suspensão é de 64.96% (TABELA 5) e, por este motivo é considerada uma suspensão heterogênea.

Para a terceira suspensão de concentração 1 mg/mL, os resultados encontrados foram surpreendentes. Esta suspensão foi que apresentou o menor tamanho de partículas entre as três suspensões: entre 11 nm e 531 nm, com a maioria das partículas de tamanho médio de 54.87 nm (FIGURA 29). O valor do potencial zeta calculado para esta suspensão foi de +77.4 mV, sendo esta a única suspensão estável utilizada neste experimento. Com relação à porcentagem de polidispersão, esta suspensão também foi considerada heterogênea, pois o valor calculado foi de 49.70%, estando acima dos 20% críticos para as suspensões de nanopartículas (TABELA 5).

TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS AVALIADAS PELO APARELHO ZETA SIZER®, DAS TRÊS SUSPENSÕES COLOIDAIS DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,01 mg/mL; 0,1 mg/mL E 1 mg/mL.

Concentração (mg/mL)	Tamanho (d.nm/intensidade)	Potencial Zeta (mV)	% de Polidispersão
0.01	234.4	-15.5 mV	86.66
0.1	425.8	14.1 mV	64.96
1	54.87	77.4 mV	49.70

FIGURA 16 - GRÁFICO QUE MOSTRA OS PICOS DE INTENSIDADE RELATIVOS AO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS, CAPTURADOS PELO APARELHO ZETA SIZER®.



Bioensaios

Concentração do metal alumínio nos tecidos

No músculo da espécie *Hoplias intermedius* (TABELA 6) a concentração de alumínio encontrado no músculo dos peixes ficou muito acima do limite de detecção ($>0,10$ mg/Kg). Como anteriormente citado, o sulfato de alumínio é muito utilizado no tratamento de água e esta pode ser uma das razões pelas quais exista uma quantidade excessiva de alumínio no tecido muscular dos indivíduos do grupo controle.

TABELA 6 - QUANTIFICAÇÃO DO ALUMÍNIO NO TECIDO MUSCULAR DE *Hoplias intermedius*, NO GRUPO CONTROLE, BEM COMO NOS GRUPOS EXPOSTOS AO ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$) E À ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Al+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Al+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Al+10 NP).

Tratamentos					
(Concentração das NpTiO ₂ em $\mu\text{g/g}$)					
	Controle	Alumínio	Al+0,1	Al+1	Al+10
Músculo	31.43	3.84	7.44	7.23	1.37

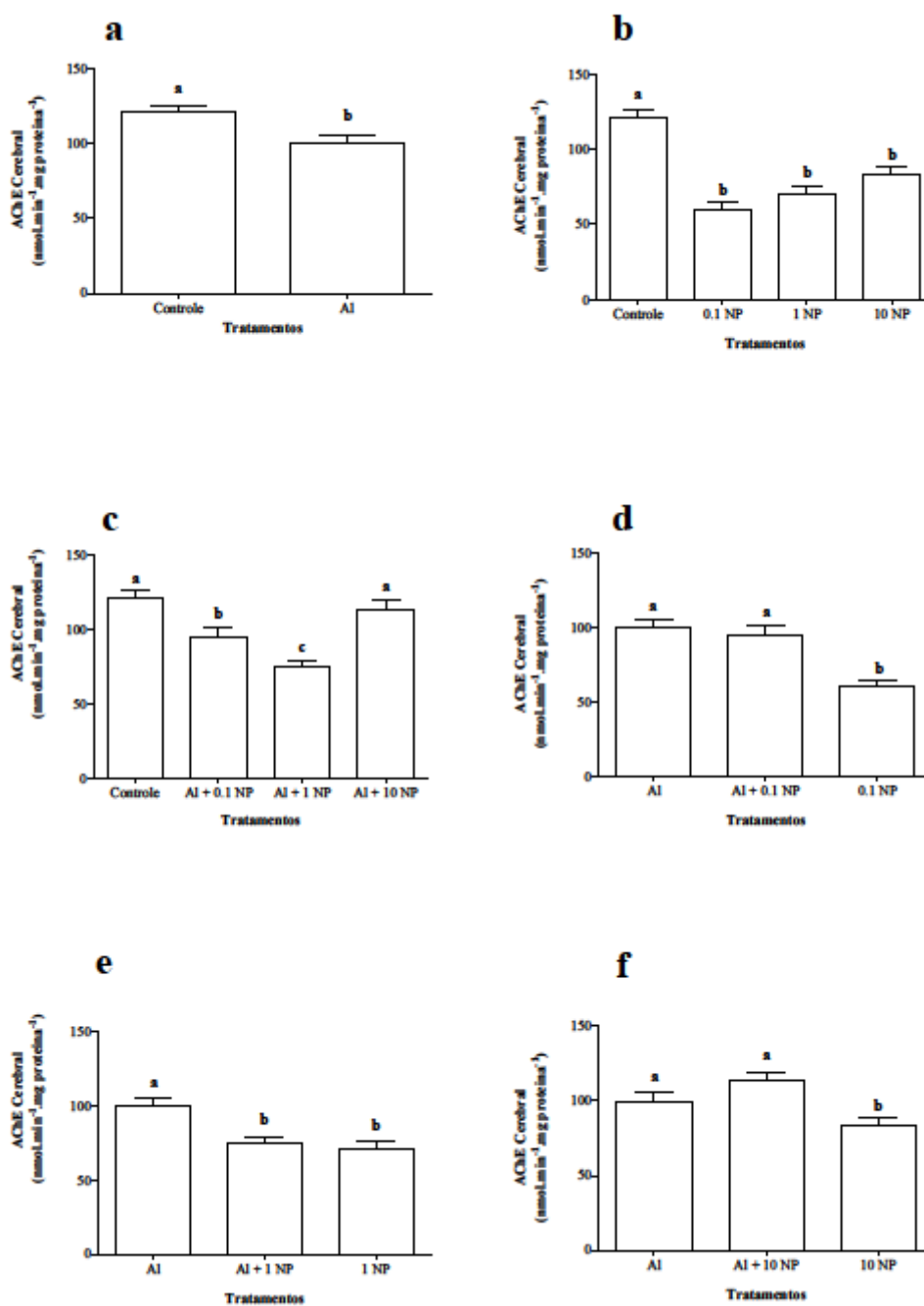
Unidade: mg de Al.kg de tecido úmido⁻¹

Biomarcadores Neurotóxicos

O grupo exposto apenas ao metal alumínio mostrou diferença na atividade da AChE cerebral com relação ao grupo controle negativo ($p=0.0087$) (FIGURA 30 – a). Quando avaliamos a AChE cerebral dos exemplares expostos às nanopartículas de TiO₂, todos os grupos mostraram uma diminuição da atividade desta enzima, quando comparados ao grupo controle negativo (FIGURA 30 – b). Em relação aos três grupos de associação de contaminantes (Al+NPs), dois grupos apresentaram uma redução da atividade desta enzima Al+0,1 NP e Al+1 NP, em relação ao grupo controle negativo. Já o grupo exposto à associação de contaminantes, Al+ 10 NP não mostrou nenhuma diferença na atividade desta enzima, em relação ao grupo controle negativo (FIGURA 30 - c). Para as análises dos grupos expostos à combinação dos contaminantes, foi possível verificar que, para a análise do conjunto de análises (d), apenas o grupo exposto às nanopartículas (0,1 NP) mostraram uma diminuição da atividade da AChE cerebral, quando comparados aos grupos expostos apenas ao Al e ao grupo exposto à associação destes contaminantes (Al+0,1 NP) (FIGURA 30 - d). O mesmo tipo de resposta foi encontrado para o conjunto de análises (f) (FIGURA 30 - f). Já

para o conjunto de análises (e), os grupos expostos à combinação de contaminantes (Al+1 NP), bem como o grupo exposto apenas às nanopartículas (1 NP), apresentaram uma diminuição da atividade da AChE cerebral (FIGURA 30 - e), em relação ao grupo exposto apenas ao metal Al.

FIGURA 17 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) CEREBRAL EM *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA. Al: ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Al+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Al+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

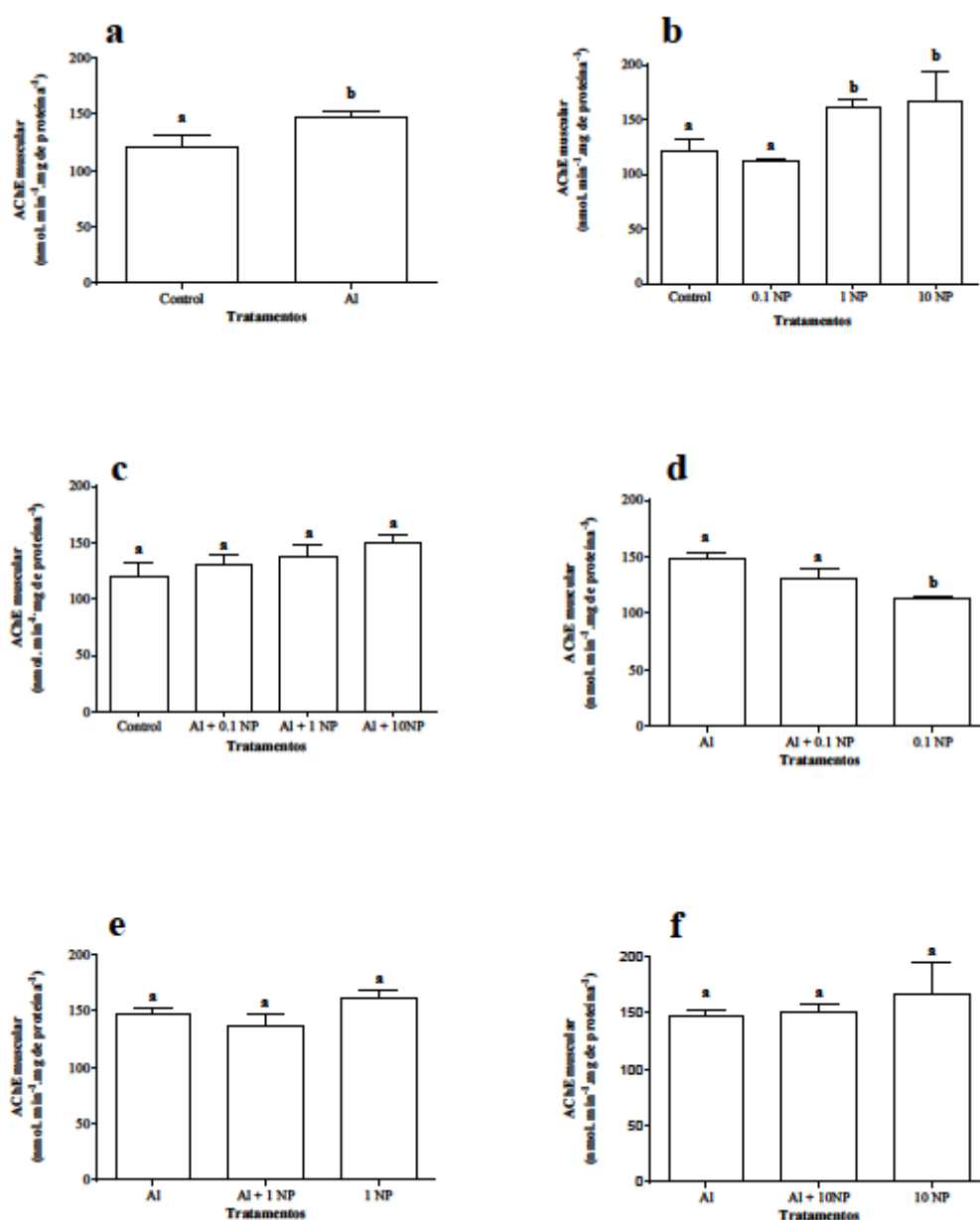


Os resultados encontrados para a atividade da AChE muscular diferem, em alguns aspectos, aos resultados encontrados para a AChE cerebral, principalmente para os grupos expostos às nanopartículas. O grupo exposto apenas ao alumínio mostrou diferença na atividade da AChE muscular com relação ao grupo controle ($p=0.0301$) (FIGURA 31 – a). Quando avaliamos a atividade da AChE muscular dos grupos expostos apenas às nanopartículas de TiO_2 , dois grupos apresentaram alterações na atividade desta enzima com relação ao grupo controle: 1 NP e 10 NP. Porém, o grupo exposto a menor concentração de nanopartículas (0,1 NP) não mostrou diferenças na atividade desta enzima, em relação ao controle negativo (FIGURA 31 – b). Em relação aos grupos expostos à associação dos contaminantes, nenhum dos três grupos expostos (Al+ 0,1 NP; Al+ 1NP e Al+ 10 NP) mostrou alterações na atividade da enzima AChE muscular quando comparado ao grupo controle negativo (FIGURA 31 – c). Para as análises dos grupos expostos à associação de contaminantes, o grupo de análise estatística (d) mostrou uma diminuição da atividade da enzima AChE muscular para o grupo exposto às nanopartículas de TiO_2 (0,1 NP), em relação ao grupo exposto ao Al e ao grupo exposto à combinação dos contaminantes (Al+0,1 NP) (FIGURA 31 – d). O conjunto de análises (e) não apresentou nenhuma modificação na atividade da enzima AChE muscular, assim como o conjunto de análises estatísticas (f) (FIGURA 31 – e, f).

Biomarcadores de biotransformação

Ao avaliarmos a atividade das GSTs hepáticas, da mesma forma que observado para o experimento com o metal chumbo, poucos resultados mostraram ser significativos. O grupo exposto apenas ao metal alumínio apresentou uma diminuição da atividade da GST, em relação ao grupo controle negativo (FIGURA 32 – a). Assim como os grupos expostos apenas às nanopartículas de TiO_2 (FIGURA 32 –b), os grupos expostos à combinação destes dois contaminantes não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo (FIGURA 32 – c). Em relação aos conjuntos de análise estatística que avaliam se existe alguma diferença de resposta entre os grupos expostos aos contaminantes de forma isolada ou quando expostos de forma conjunta, o conjunto de análises (d) mostrou um aumento da atividade da enzima GST hepática, no grupo exposto à combinação dos contaminantes (Al+0,1 NP) e no grupo exposto apenas às nanopartículas de TiO_2 (0,1 NP), frente ao grupo exposto apenas ao metal Al (FIGURA 32– d).

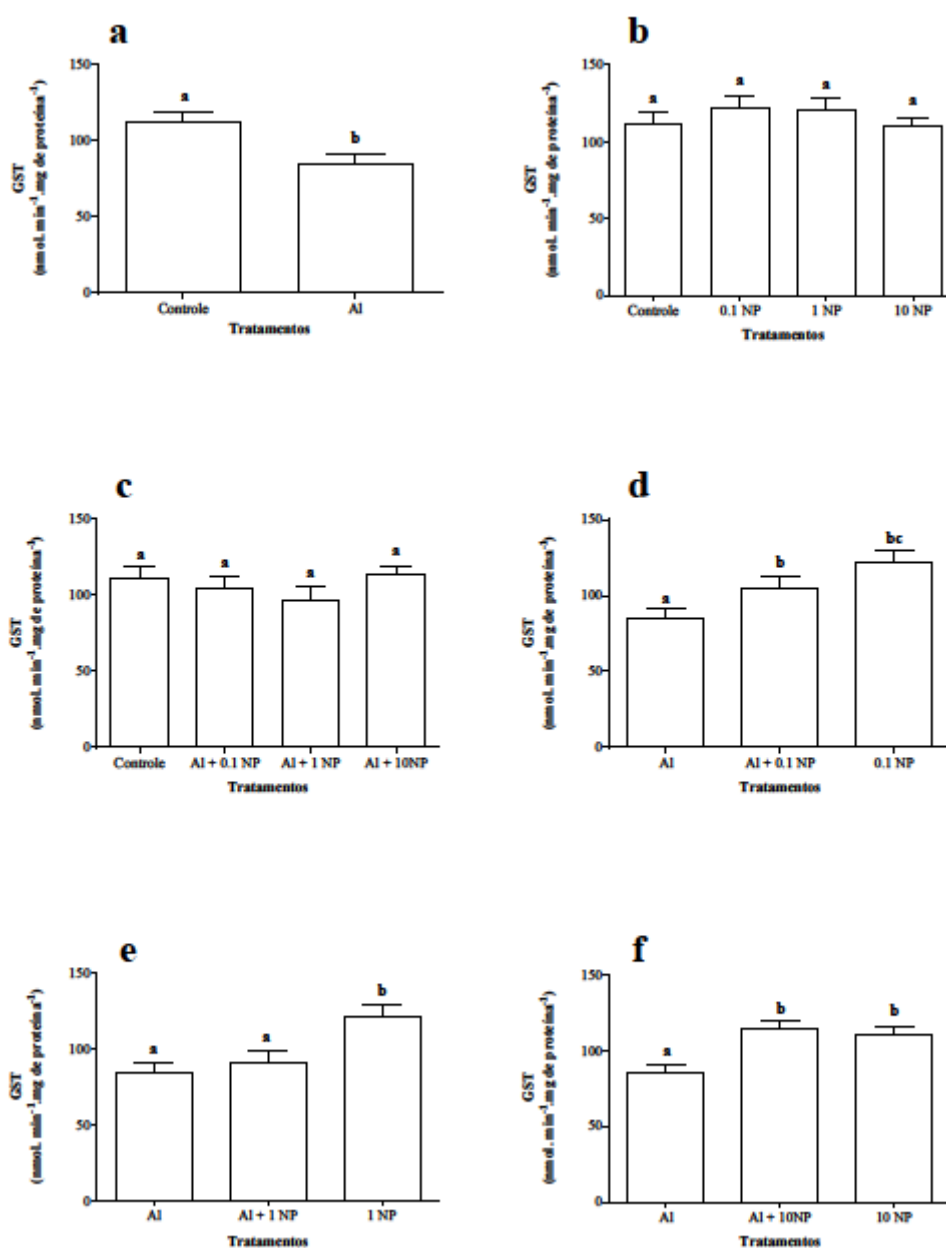
FIGURA 18 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) MUSCULAR EM *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA. Al: ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Al+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Al+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.



O conjunto de análises (e) mostrou o aumento da atividade da enzima GST para o grupo exposto apenas às nanopartículas (1 NP), em relação aos grupos expostos ao Al e aos contaminantes de forma associada (Al+1 NP) (FIGURA 32 – e). Para o conjunto de análises

(f), tanto o grupo exposto à associação de contaminantes (Al+10 NP), quanto o grupo exposto às nanopartículas (10 NP) apresentaram um aumento da atividade da enzima GST em relação ao grupo exposto somente ao metal Al (FIGURA 32 – f).

FIGURA 19 - ATIVIDADE DA GST EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. Al: ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Al+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Al+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA $p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

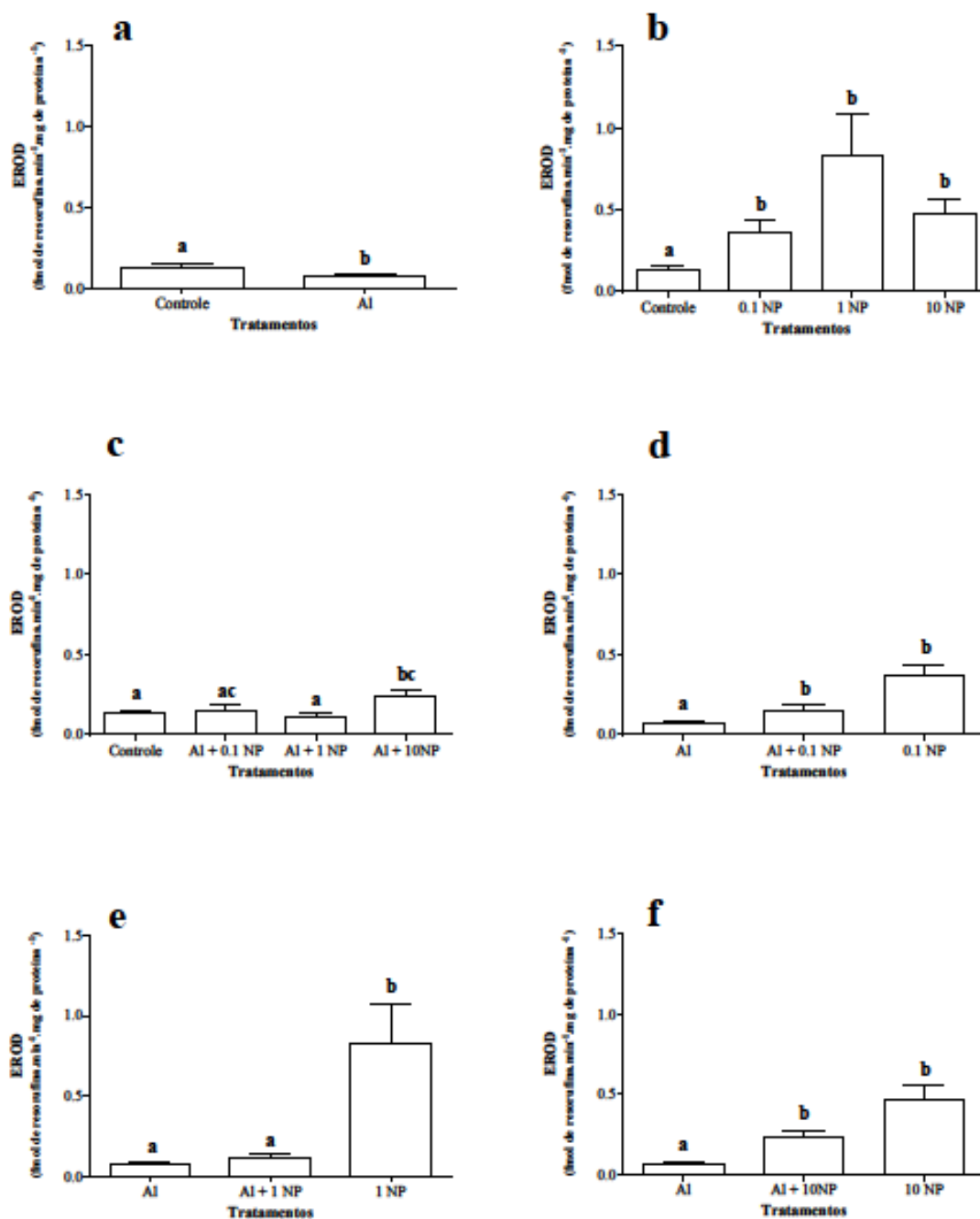


Para a atividade da EROD avaliada neste experimento, o conjunto de análises (a) mostrou uma atividade reduzida da enzima EROD no grupo exposto apenas ao alumínio, e relação ao controle negativo (FIGURA 33– a). Já o conjunto de análise que avalia a atividade da enzima EROD dos grupos expostos às três diferentes concentrações de nanopartículas (b), em relação ao controle negativo, mostrou um aumento da atividade desta enzima para os três grupos em questão (0,1 NP, 1 NP e 10 NP) (FIGURA 33– b). Porém, a resposta para os grupos expostos à associação dos contaminantes mostrou um aumento da atividade da EROD apenas para o grupo exposto à combinação Al+10 NP (FIGURA 33 – c). Para as análises dos grupos expostos à associação de contaminantes, os grupos de análise estatística apresentaram uma resposta semelhante à verificada para a enzima GST, com o conjunto (d) apresentando um aumento da atividade da enzima para os grupos expostos à combinação dos contaminantes (Al+0,1 NP) e no grupo exposto apenas às nanopartículas de TiO₂ (0,1 NP), frente ao grupo exposto apenas ao metal Al (FIGURA 33 – d). O conjunto de análise (e) mostrou o aumento da atividade da enzima GST para o grupo exposto apenas às nanopartículas (1 NP), em relação aos grupos expostos ao Al e aos contaminantes de forma associada (Al+1 NP) (FIGURA 33 – e). Para o conjunto de análises (f), tanto o grupo exposto à associação de contaminantes (Al+10 NP), quanto o grupo exposto às nanopartículas (10 NP) apresentaram um aumento da atividade da enzima em relação ao grupo exposto somente ao metal Al (FIGURA 33 – f).

Biomarcadores de estresse oxidativo

Ao analisarmos o resultado da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), o grupo exposto ao alumínio de forma isolada não apresentou diferenças na atividade desta enzima quando comparado ao grupo controle negativo ($p = 0,2460$) (FIGURA 34 – a). Os grupos expostos às nanopartículas de TiO₂ nas três diferentes concentrações, apresentaram um aumento na atividade da SOD hepática em relação ao controle negativo, de forma semelhante (FIGURA 34 – b). Quando analisamos os três grupos de contaminantes associados, frente ao controle negativo, observamos uma inibição da atividade em dois destes grupos, a saber: Al+0,1 NP e o Al+1 NP. O terceiro grupo (Al+10 NP), com a maior dose de nanopartículas de TiO₂, não apresentou diferenças com relação ao controle negativo (FIGURA 34 – c).

FIGURA 20 - ATIVIDADE DA EROD EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. AL: ALUMÍNIO (50 MG/G); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($P < 0,05$).



Ao avaliarmos os grupos de associação dos contaminantes em comparação com os grupos expostos aos contaminantes de forma isolada, o conjunto de análise estatística referente à menor concentração de nanopartículas de TiO_2 (d), observamos um aumento da atividade desta enzima no grupo exposto às nanopartículas (0,1 NP) e uma diminuição da atividade desta enzima no grupo exposto ao $\text{Al}+0.1$ NP, quando ambos foram comparados ao grupo exposto apenas ao metal alumínio (FIGURA 34 – d). Porém, ao avaliarmos os outros dois conjuntos, o grupo (e) apresentou uma diminuição da atividade da enzima SOD, apenas para os exemplares expostos à combinação de contaminantes ($\text{Al}+1$ NP), enquanto que para os grupos expostos de forma isolada não foram observadas diferenças na atividade da enzima (FIGURA 34 – e). Durante a análise do conjunto (f), observamos o aumento da atividade enzimática para o grupo exposto apenas às nanopartículas (10 NP), enquanto que para os grupos exposto apenas ao metal alumínio, de forma isolada, e para o grupo exposto à associação entre os contaminantes, não foram observadas diferenças na atividade da enzima (FIGURA 34 – f).

Os resultados das análises estatísticas para a atividade da enzima catalase (CAT) hepática mostraram alterações relevantes, principalmente nos grupos de associação com o metal alumínio. Para o conjunto de análises (a), o grupo exposto ao alumínio de forma isolada apresentou um aumento na atividade desta enzima quando comparado ao grupo controle negativo ($p = 0,0056$) (FIGURA 35 – a). Os grupos expostos às nanopartículas de TiO_2 nas três diferentes concentrações, não apresentaram alteração na CAT em relação ao grupo exposto ao controle negativo ($p = 0.1349$) (FIGURA 35 – b). Da mesma forma, os grupos expostos à combinação de contaminantes ($\text{Al}+0,1$ NP, $\text{Al}+1$ NP e $\text{Al}+10$ NP) não demonstraram alterações significativas na atividade da enzima, quando comparadas ao grupo controle negativo (FIGURA 35 – c). Porém, ao avaliarmos os grupos de associação dos contaminantes em comparação com os grupos expostos aos contaminantes de forma isolada, o conjunto de análise estatística referente à menor concentração de nanopartículas de TiO_2 (d), mostrou a diminuição da atividade da enzima CAT nos grupos $\text{Al}+0,1$ NP e 0,1 NP, quando estes grupos foram comparados com o grupo exposto apenas ao metal alumínio ($p=0.0135$) (FIGURA 35 – d). A mesma resposta pôde ser verificada para o conjunto de análise (e), no qual os grupos $\text{Al}+1$ NP e 1 NP mostraram uma diminuição da atividade da enzima CAT frente ao grupo exposto apenas ao metal alumínio ($p=0.0051$) (FIGURA 35 – e). Para o conjunto de análises (f), foi possível verificar que ocorreu uma diminuição da atividade da enzima CAT no grupo exposto apenas às nanopartículas de TiO_2 (10 NP), em relação aos outros grupos inclusos nesta análise ($p=0.0004$) (FIGURA 35 – f).

FIGURA 21 - ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. Al: ALUMÍNIO (50 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($p < 0,05$).

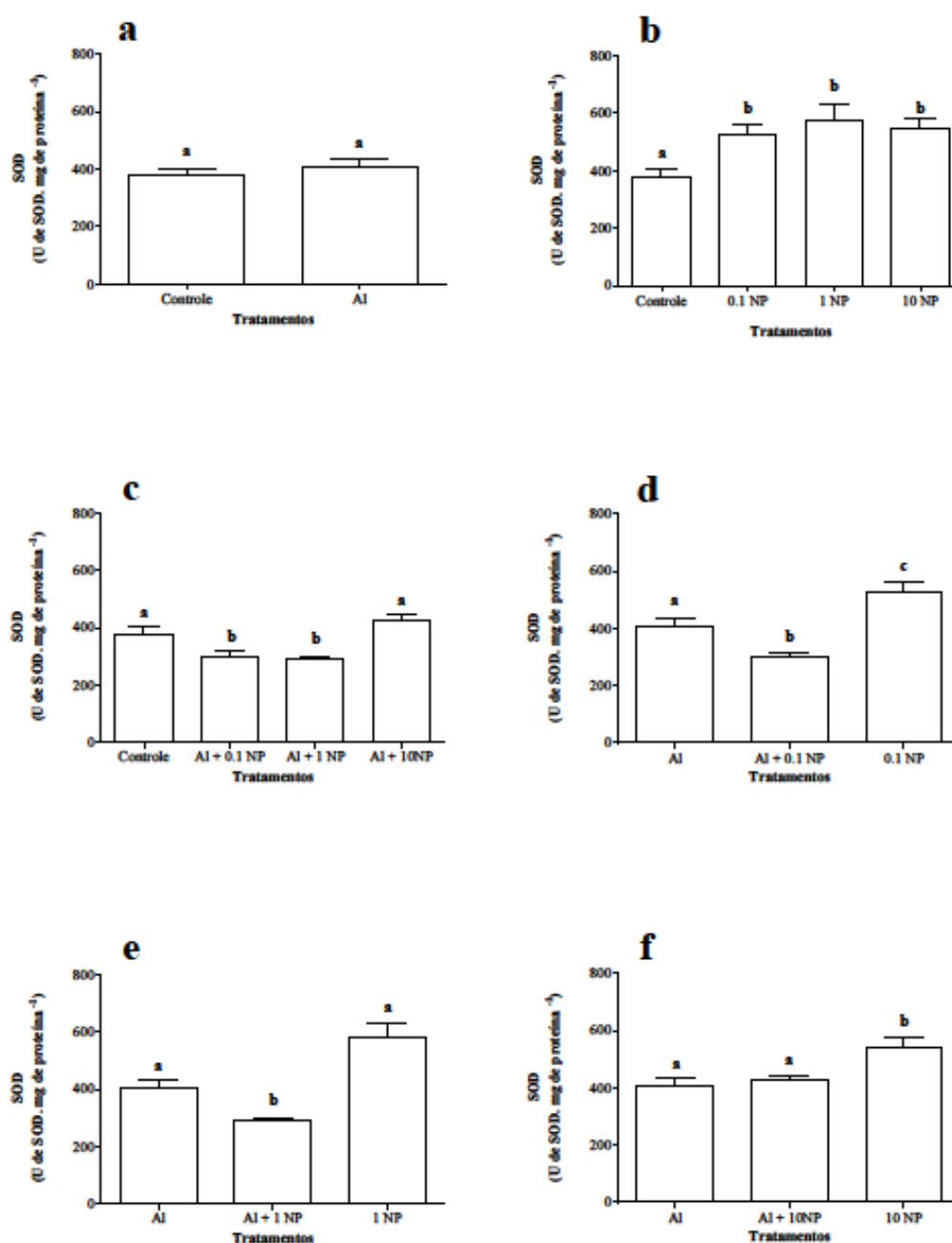
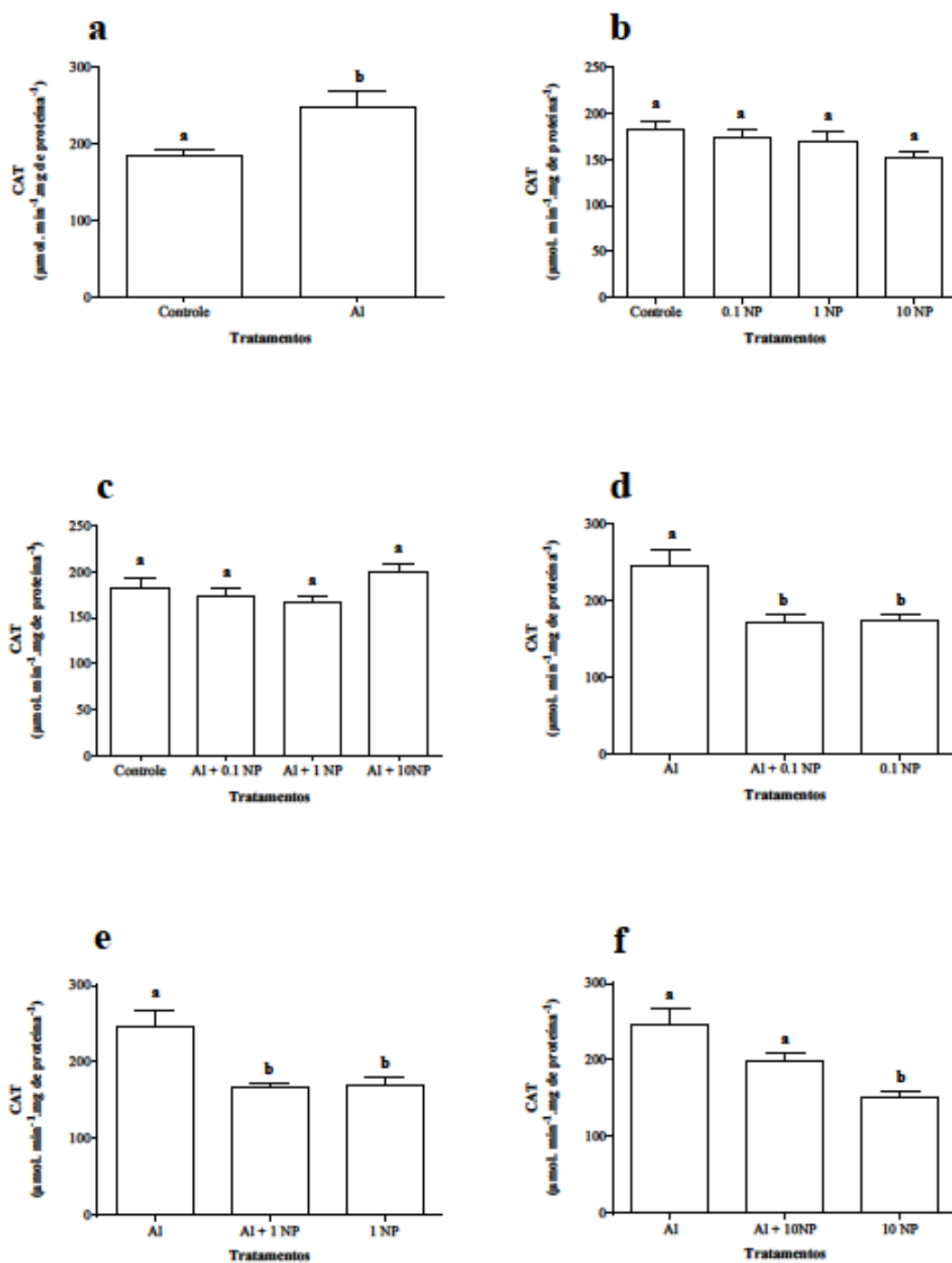


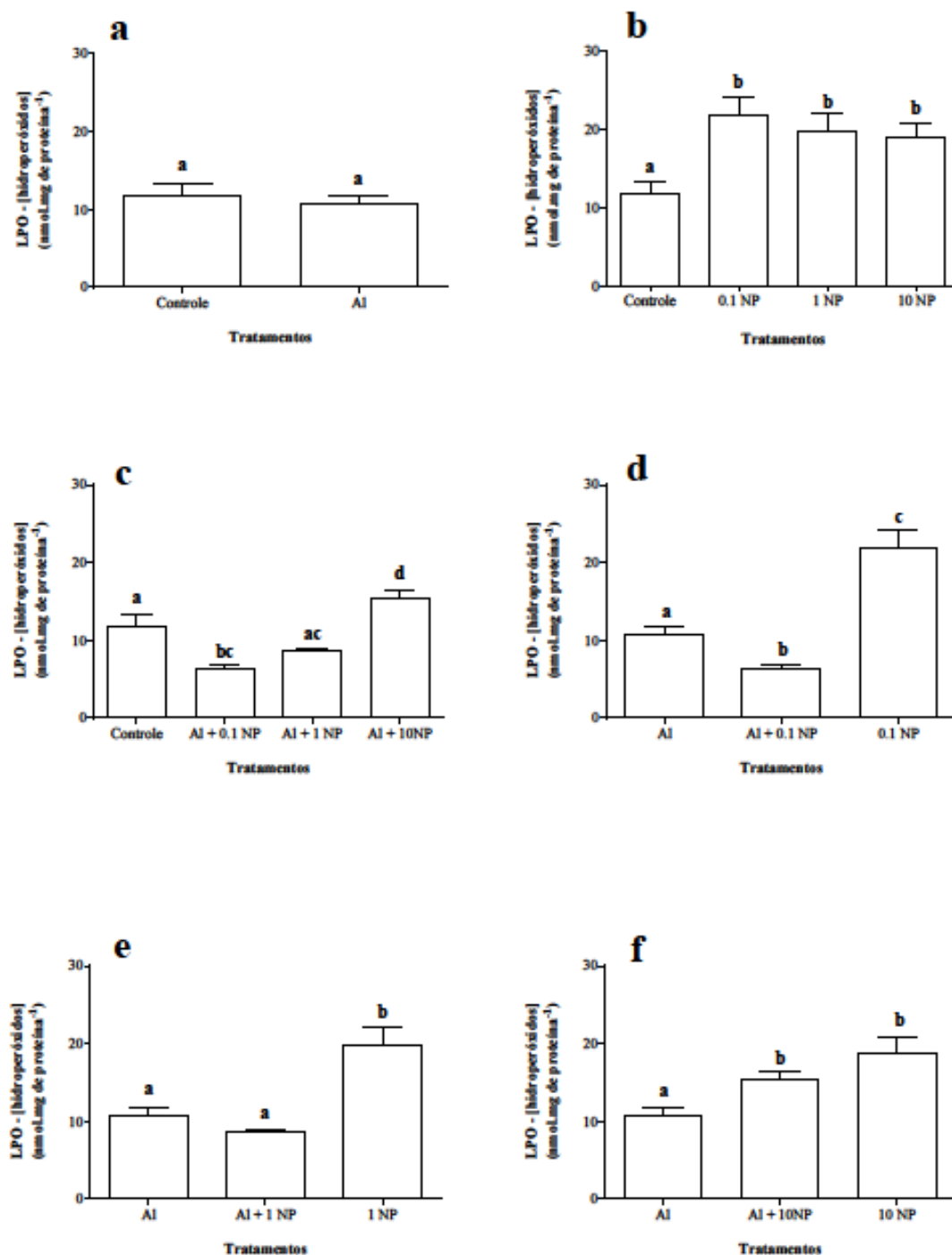
FIGURA 22 - ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE (CAT) EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. Al: ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Al+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Al+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($p < 0,05$).



Alterações em macromoléculas

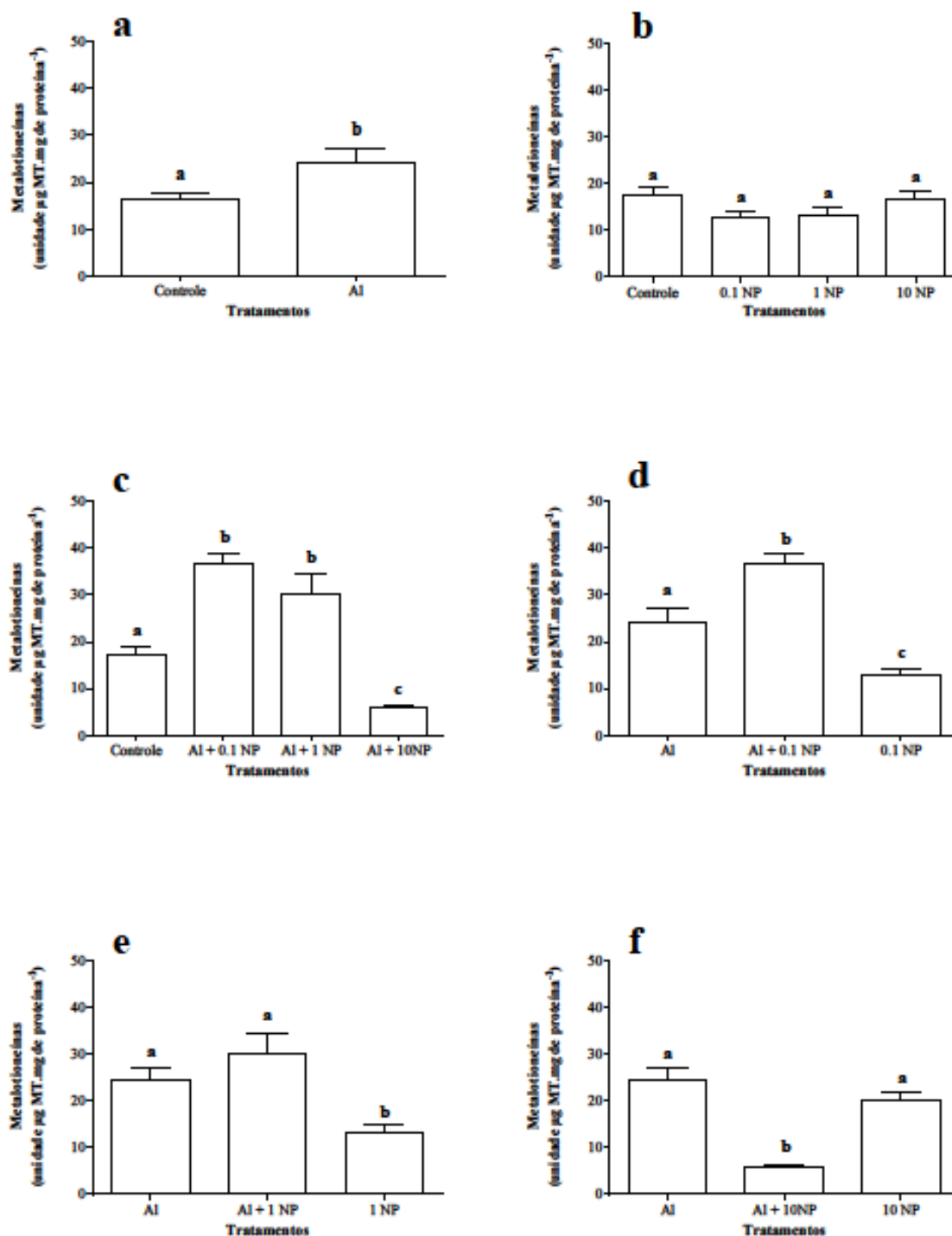
Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) avaliados neste experimento mostraram que, para o grupo exposto ao alumínio de forma isolada não ocorreu nenhuma alteração da peroxidação lipídica, quando comparado ao grupo controle negativo ($p=0.2876$) (FIGURA 36 – a). Já para os conjuntos estatísticos que avaliam apenas os grupos expostos às nanopartículas de TiO_2 , foi possível evidenciar um aumento da peroxidação lipídica para os três grupos, de forma semelhante, em relação ao controle negativo (FIGURA 36 – b). Para o conjunto de análise (c), dois grupos apresentaram alterações relevantes na quantidade de hidroperóxidos. O grupo exposto aos contaminantes, Al+0,1 NP, mostrou uma diminuição na quantidade de hidroperóxidos, enquanto que o grupo exposto à combinação Al+10 NP mostrou um aumento da concentração de hidroperóxidos ambos em comparação com o grupo controle negativo. O grupo exposto à combinação Al+ 1 NP não apresentou diferenças em relação ao grupo controle negativo (FIGURA 36 – c). Porém, com relação aos conjuntos estatísticos que avaliam a associação de contaminantes frente aos grupos que foram expostos a eles de forma isolada, os resultados foram diferentes. Para o conjunto de análise (d), o grupo exposto às nanopartículas de TiO_2 (0,1 NP) mostrou um aumento da concentração de hidroperóxidos, em relação ao alumínio e ao grupo exposto aos contaminantes associados. Já o grupo exposto à associação destes contaminantes (Al+ 0,1 NP) foi possível verificar uma diminuição da concentração de hidroperóxidos ($p=0.0001$) (FIGURA 36 – d). Para a avaliação do conjunto de análises (e), o único grupo a apresentar um aumento da concentração de hidroperóxidos em relação aos outros grupos desta análise (Al e Al+1 NP) foi o grupo exposto apenas às nanopartículas de TiO_2 (1 NP) ($p=0.0002$) (FIGURA 36– e). Para o conjunto de análise (f), os grupos expostos à combinação de contaminantes (Al+ 10 NP) e apenas às nanopartículas (10 NP), apresentaram um aumento da concentração de hidroperóxidos, quando comparados com o grupo exposto apenas ao alumínio ($p=0.0027$) (FIGURA 36 – f).

FIGURA 23 - AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. AI: ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (AI+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (AI+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (AI+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($p < 0,05$).



A concentração de metalotioneínas (MTs) nas células hepáticas mostrou um aumento em relação ao controle negativo, no grupo exposto ao metal alumínio de forma isolada ($p=0,0057$) (FIGURA 37 – a). Já para os conjuntos estatísticos que avaliam apenas os grupos expostos às nanopartículas de TiO_2 , não foi possível evidenciar qualquer alteração significativa na concentração de metalotioneínas neste tipo celular, em relação ao grupo controle negativo ($p=0,3626$) (FIGURA 37 – b). Para o conjunto de análise (c), dois grupos expostos à associação dos contaminantes mostraram um aumento da concentração de metalotioneínas: $\text{Al}+0,1 \text{ NP}$ e $\text{Al}+1 \text{ NP}$, quando comparados ao controle negativo. Porém, o grupo exposto à associação de alumínio e nanopartículas de TiO_2 ($\text{Al}+10 \text{ NP}$) mostrou uma diminuição da concentração de metalotioneínas, em relação ao grupo controle negativo (FIGURA 37 – c). Para o conjunto estatístico (d), o grupo exposto apenas às nanopartículas de TiO_2 ($0,1 \text{ NP}$) apresentou uma diminuição da concentração de metalotioneínas, em relação aos outros dois grupos avaliados (Al e $\text{Al}+0,1 \text{ NP}$). Porém, para o grupo exposto à associação de contaminantes, $\text{Al}+0,1 \text{ NP}$ verificou-se um aumento da concentração de metalotioneínas em relação aos outros dois grupos avaliados (Al e $0,1 \text{ NP}$) (FIGURA 37 – d). Para o conjunto de análises (e), ocorreu uma diminuição da concentração de metalotioneínas no grupo exposto apenas às nanopartículas de TiO_2 , enquanto que para os outros grupos avaliados nesta análise (Al e $\text{Al}+1 \text{ NP}$), não houve diferença na concentração destas enzimas (FIGURA 37 – e). Porém, para o conjunto de análises (f), ocorreu uma resposta contrária à análise do conjunto anterior: o grupo exposto à associação dos contaminantes ($\text{Al}+10 \text{ NP}$) apresentou uma diminuição da concentração de metalotioneínas, em relação aos outros dois grupos deste conjunto de análise (Al e $\text{Al}+10 \text{ NP}$) (FIGURA 37 – f).

FIGURA 24 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS (MTs) EM FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, PARA TODOS OS GRUPOS DE ANÁLISE. Al: alumínio (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Al+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Al+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($p < 0,05$).



Teste do micronúcleo písceo e alterações morfológicas nucleares

Ao analisarmos as alterações morfológicas nucleares juntamente com o número de micronúcleos, observamos que nenhum dos conjuntos de análise mostrou diferenças nas quantidades de alterações encontradas (FIGURA 38). As análises realizadas para cada tipo de alteração morfológica analisada neste estudo se encontram na TABELA 7. As análises das frequências de micronúcleos, bem como das alterações do tipo *blebbed* e binúcleo não apresentaram diferenças para nenhum dos conjuntos de análise estatística. Para as alterações do tipo *notched*, *vacuolated* e *lobed*, alguns conjuntos de análise mostraram diferenças nas frequências dessas alterações e estão evidenciadas na TABELA 7.

FIGURA 25 - NÚMERO DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES E MICRONÚCLEOS EM ERITRÓCITOS DE *Hoplias intermedius*. Al: ALUMÍNIO (50 µg/g); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (Al+0.1 NP), 1 µg/g (Al+1 NP), 10 µg/g (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 µg/g (0.1 NP), 1 µg/g (1 NP), 10 µg/g (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

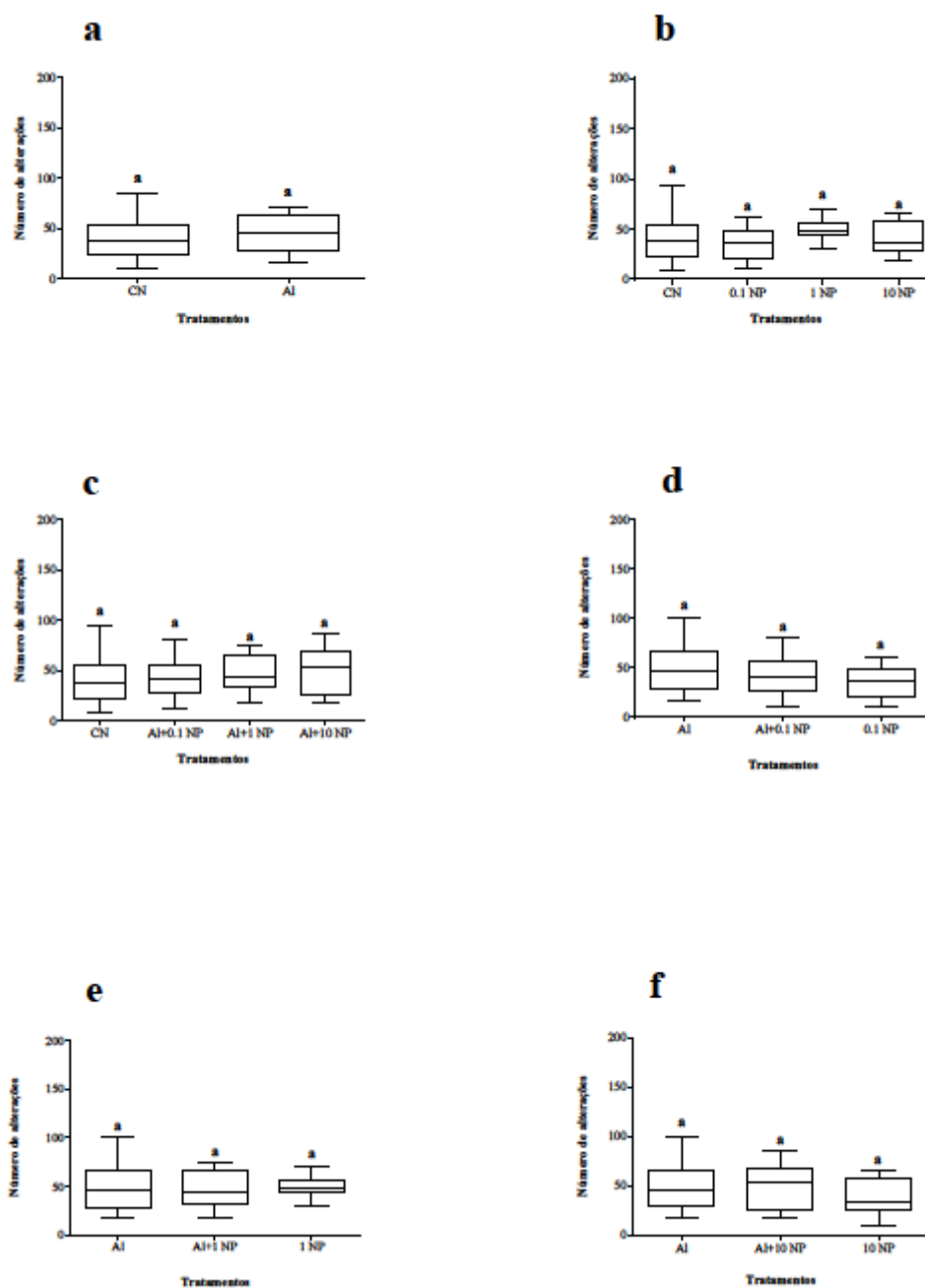


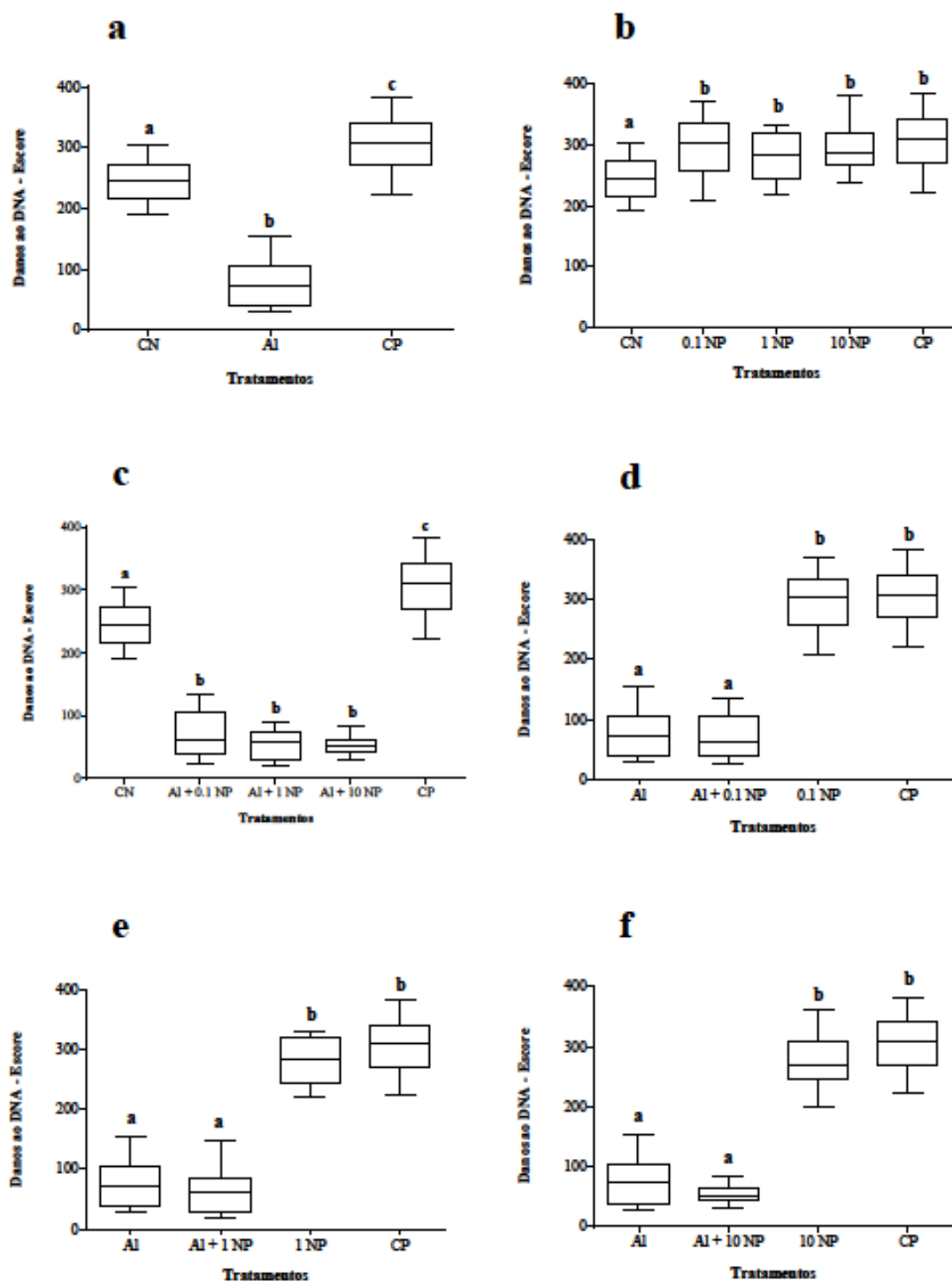
TABELA 7 - FREQUÊNCIA MÉDIA DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES EM ERITRÓCITOS DE *Hoplias intermedius*, SEPARADAS ENTRE MICRONÚCLEO, BINÚCLEO, *BLEBBED*, *LOBED*, *NOTCHED*, *VACUOLATED* E TOTAL DE AMNs. COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES CONJUNTOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA. VALORES EXPRESSOS EM MÉDIA E ERRO PADRÃO. A PRESENÇA DE ASTERISCO INDICA DIFERENÇA ENTRE OS TRATAMENTOS ($p < 0,05$).

Tratamentos		MNs	Binucleus	<i>Blebbled</i>	<i>Lobed</i>	<i>Notched</i>	<i>Vacuolated</i>	Total AMNs
A	CN	0.1034 ± 0.4093	0.2759 ± 0.5276	2.9660 ± 2.5980	1.1030 ± 2.006	11.720 ± 8.548	23.720 ± 13.980	39.070 ± 19.230
	AI	0.1176 ± 0.4851	0.0588 ± 0.2425	2.4120 ± 2.1520	0.9412 ± 1.029	15.120 ± 10.340	28.470 ± 14.000	43.810 ± 18.670
B	CN	0.1034 ± 0.4093	0.2759 ± 0.5276	2.9660 ± 2.5980	1.1030 ± 2.000	11.720 ± 8.548	23.720 ± 13.980	39.070 ± 19.230
	0,1 NP	0.0555 ± 0.2357	0.4375 ± 0.7274	2.4380 ± 1.2090	1.7500 ± 2.017	16.250 ± 9.692	21.750 ± 20.930	36.330 ± 14.620
	1 NP	0.2778 ± 0.4609	0.3889 ± 0.6978	3.7220 ± 2.8660	2.3330 ± 2.223	20.110 ± 6.096*	26.830 ± 14.450	50.000 ± 10.400
	10 NP	0.2632 ± 0.5620	0.2632 ± 0.6534	3.1050 ± 2.2580	2.9440 ± 3.438	18.580 ± 12.94*	25.320 ± 18.740	44.440 ± 20.430
C	CN	0.1034 ± 0.4093	0.2759 ± 0.5276	2.9660 ± 2.5980	1.1030 ± 2.006	11.720 ± 8.548	23.720 ± 13.980	39.070 ± 19.230
	AI+ 0,1 NP	0.1875 ± 0.4031	0.5000 ± 0.7303	2.5630 ± 1.8960	2.0000 ± 2.066	18.060 ± 9.950*	18.940 ± 8.629	42.250 ± 18.140
	AI + 1 NP	0.1875 ± 0.4031	0.3125 ± 0.6021	2.4380 ± 1.6320	2.7500 ± 2.646*	17.560 ± 9.423*	24.380 ± 12.660	47.630 ± 18.140
	AI+ 10 NP	0.2000 ± 0.5606	0.6667 ± 1.1750	3.9330 ± 4.2500	3.0000 ± 4.629*	21.000 ± 11.77*	20.730 ± 10.720	49.530 ± 22.250
D	AI	0.1176 ± 0.4851	0.0588 ± 0.2425	2.4120 ± 2.1520	0.9412 ± 1.029	15.120 ± 10.340	28.470 ± 14.00*	43.810 ± 18.670
	AI + 0,1 NP	0.1875 ± 0.4031	0.5000 ± 0.7303	2.5630 ± 1.8960	2.0000 ± 2.066	18.060 ± 9.950	18.940 ± 8.629	42.250 ± 18.140
	0,1 NP	0.0555 ± 0.2357	0.4375 ± 0.7274	2.4380 ± 1.2090	1.7500 ± 2.017	16.250 ± 9.692	21.750 ± 20.93*	36.330 ± 14.620
E	AI	0.1176 ± 0.4851	0.0588 ± 0.2425	2.4120 ± 2.1520	0.9412 ± 1.029	15.120 ± 10.340	28.470 ± 14.000	43.810 ± 18.670
	AI + 1 NP	0.1875 ± 0.4031	0.3125 ± 0.6021	2.4380 ± 1.6320	2.7500 ± 2.646*	17.560 ± 9.423	24.380 ± 12.660	47.630 ± 18.140
	1 NP	0.2778 ± 0.4609	0.3889 ± 0.6978	3.7220 ± 2.8660	2.3330 ± 2.223*	20.110 ± 6.096	26.830 ± 14.450	50.000 ± 10.400
F	AI	0.1176 ± 0.4851	0.0588 ± 0.2425	2.4120 ± 2.1520	0.9412 ± 1.0290	15.120 ± 10.340	28.470 ± 14.000	43.810 ± 18.670
	AI + 10 NP	0.2000 ± 0.5606	0.6667 ± 1.1750	3.9330 ± 4.2500	3.0000 ± 4.6290	21.000 ± 11.770	20.730 ± 10.720	49.530 ± 22.250
	10 NP	0.2632 ± 0.5620	0.2632 ± 0.6534	3.1050 ± 2.2580	2.9440 ± 3.4380	18.580 ± 12.940	25.320 ± 18.740	44.440 ± 20.430

Ensaio cometa em eritrócitos

Em relação ao conjunto de análise (a), o alumínio apresentou um menor índice de danos no material genético, quando comparado ao controle negativo ($p < 0.0001$) (FIGURA 39 – a). Em relação ao conjunto de análise (b), que avalia apenas a resposta das nanopartículas frente ao controle negativo, os três grupos expostos às nanopartículas apresentaram diferenças, sendo as três concentrações (0,1 NP, 1 NP e 10 NP) mostraram um nível de dano similar ao grupo controle positivo ($p = 0.0007$) (FIGURA 39 – b). Já o conjunto de análise (c), que avalia os grupos expostos à associação dos contaminantes em relação ao grupo controle negativo, os três grupos expostos à associação dos contaminantes (Al/+0,1 NP; Al/+1 NP e Al/+10 NP) mostraram uma diminuição dos danos ao material genético, em relação ao controle negativo ($p < 0.0001$) (FIGURA 39 – c). Para os conjuntos de análise (d), (e) e (f), que avaliam os grupos expostos à combinação de contaminantes em comparação a ambos os contaminantes de forma isolada, todos os conjuntos de análise apresentaram o mesmo tipo de resposta: os grupos expostos apenas ao metal alumínio e à associação do alumínio com as nanopartículas de TiO_2 , não apresentaram diferenças com relação ao dano no material genético, porém os grupos expostos apenas às nanopartículas de TiO_2 , todos os grupos apresentaram um aumento nos danos observados no material genético ($p < 0.0001$) (FIGURA 39 – d, e, f).

FIGURA 26 - DANOS AO DNA DE ERITRÓCITOS DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. Al: ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Al+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Al+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($P < 0,05$).



Ensaio cometa em brânquias

No conjunto de análises (a) podemos perceber que o grupo exposto ao alumínio não causou danos ao material genético das brânquias frente ao controle negativo (FIGURA 40 – a). Já para os conjuntos de análises (b) e (c), os resultados foram opostos. No conjunto de análises (b) que avalia os três grupos expostos às nanopartículas em relação ao controle negativo, foi possível verificar um aumento nos danos ao material genético para as três concentrações de nanopartículas utilizadas neste experimento ($p < 0.0001$) (FIGURA 40 – b). Para o conjunto de análise (c), que avalia os três grupos expostos à associação dos contaminantes em relação ao controle negativo, os três grupos (Al+0,1 NP; Al+1 NP e Al+ 10 NP) não apresentaram diferenças em relação ao controle negativo e não possuíram diferenças entre si ($p < 0.0001$) (FIGURA 40 – c). Quando analisamos as respostas dos conjuntos de análise (d), (e) e (f), verificamos o mesmo tipo de resposta para os três conjuntos de análise, de forma similar às respostas observadas no ensaio cometa em eritrócitos: os grupos expostos apenas ao metal alumínio e à associação do alumínio com as nanopartículas de TiO_2 , não apresentaram diferenças com relação aos danos no material genético, porém os grupos expostos apenas às nanopartículas de TiO_2 , todos os grupos apresentaram um aumento nos danos observados no material genético ($p < 0.0001$) (FIGURA 40 – d, e, f)

Ensaio cometa fígado

No conjunto de análises (a) podemos perceber que o grupo exposto ao alumínio não causou danos ao material genético das células do fígado, frente ao controle negativo (FIGURA 41 – a). Já para os conjuntos de análises (b) e (c), os resultados foram semelhantes. No conjunto de análises (b) que avalia os três grupos expostos às nanopartículas em relação ao controle negativo, não foi possível verificar um aumento nos danos ao material genético para as três concentrações de nanopartículas utilizadas neste experimento ($p = 0.3135$) (FIGURA 41 – b). Para o conjunto de análise (c), que avalia os três grupos expostos à associação dos contaminantes em relação ao controle negativo, os três grupos (Al+0,1 NP; Al+1 NP e Al+ 10 NP) não apresentaram diferenças em relação ao controle negativo e não possuíram diferenças entre si ($p = 0.0829$) (FIGURA 41 – c). Quando analisamos as respostas dos conjuntos de análise (d), (e) e (f), verificamos o mesmo tipo de resposta para os três conjuntos de análise, de forma similar às respostas observadas no ensaio cometa em eritrócitos e em brânquias: os grupos expostos apenas ao metal alumínio e à associação do alumínio com as nanopartículas de TiO_2 , para as três concentrações (0,1 NP, 1NP, 10NP), não apresentaram diferenças com relação aos danos no material genético. Os grupos expostos

apenas às nanopartículas de TiO_2 (0,1 NP, 1NP, 10NP), apresentaram um aumento nos danos observados no material genético ($p < 0.0001$) (FIGURA 41 – d, e, f).

FIGURA 27 - DANOS AO DNA DAS BRÂNKIAS DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. Al: ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Al+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Al+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Al+10NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($p < 0,05$).

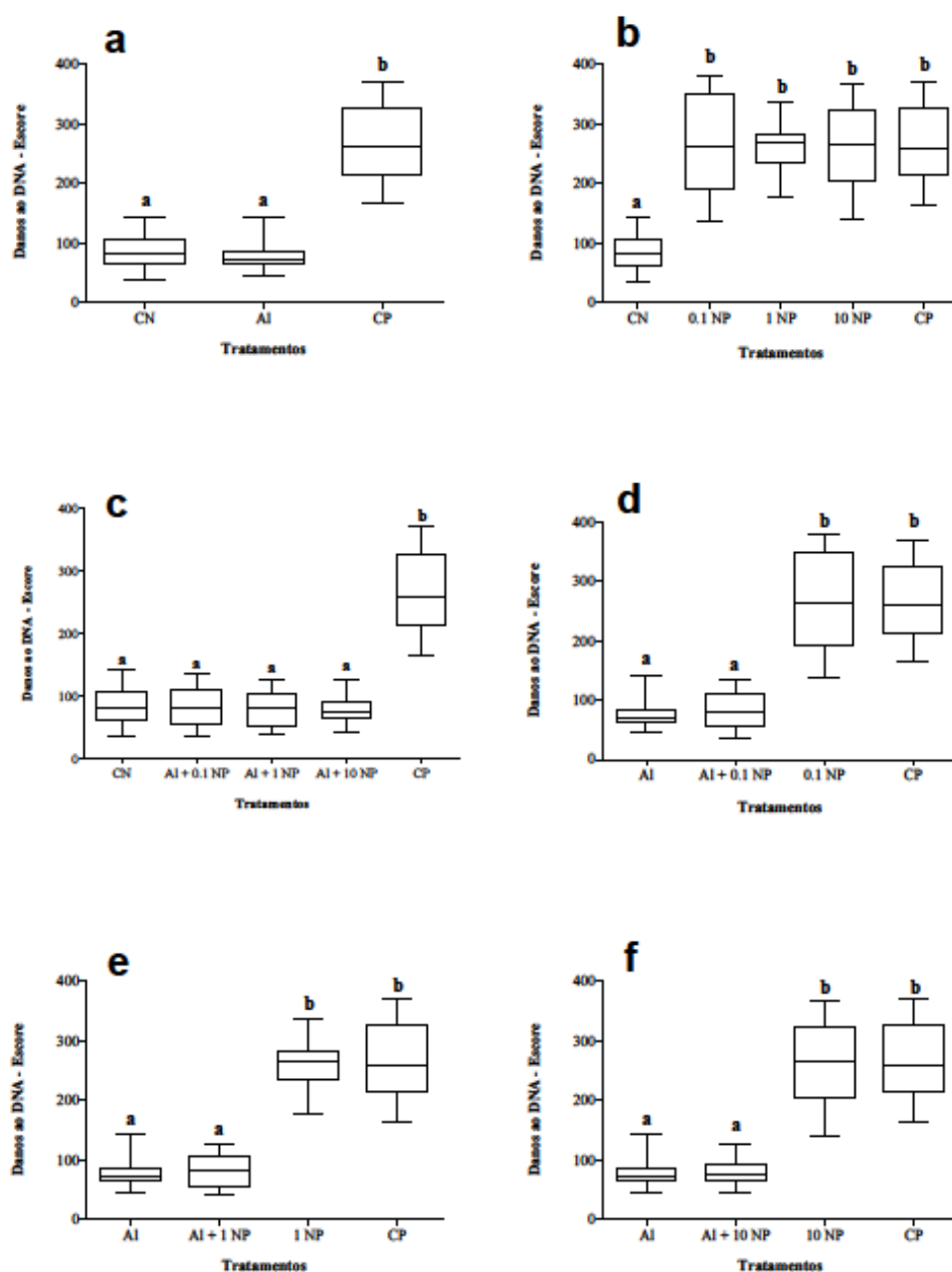
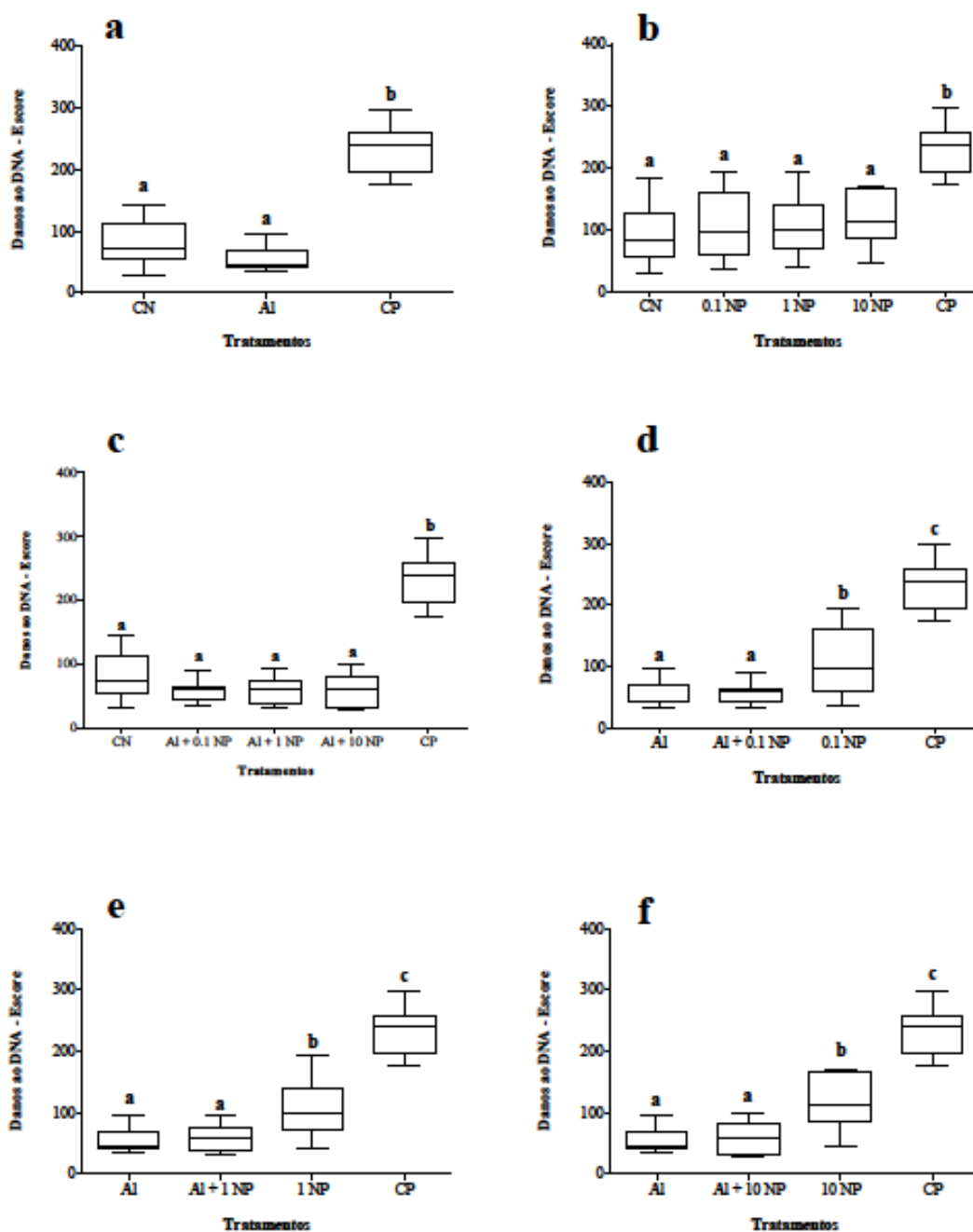


FIGURA 28 - DANOS AO DNA DO FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA. Al: ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Al+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Al+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TRATAMENTOS ($p < 0,05$).



Ensaio cometa rim

Em relação ao conjunto de análise (a), o grupo exposto ao alumínio não apresentou diferenças nos danos causados ao material genético, quando comparado ao controle negativo (FIGURA 42 – a). Em relação ao conjunto de análise (b), que avalia apenas a resposta das nanopartículas frente ao controle negativo, os três grupos expostos às nanopartículas apresentaram diferenças, sendo as três concentrações (0,1 NP, 1 NP e 10 NP) mostraram um aumento nos níveis de dano em relação ao grupo controle negativo ($p < 0.0001$) (FIGURA 42 – b). Já o conjunto de análise (c), que avalia os grupos expostos à associação dos contaminantes em relação ao grupo controle negativo, os três grupos expostos à associação dos contaminantes (Al+0,1 NP; Al+1 NP e Al+ 10 NP) não mostraram diferenças nos danos causados ao material genético, em relação ao controle negativo ($p = 0.0805$) (FIGURA 42 – c). Para os conjuntos de análise (d), (e) e (f), que avaliam os grupos expostos à combinação de contaminantes em comparação a ambos os grupos expostos aos contaminantes de forma isolada, todos os conjuntos de análise apresentaram o mesmo tipo de resposta: os grupos expostos apenas ao metal alumínio e à associação do alumínio com as nanopartículas de TiO_2 e os grupos expostos apenas às nanopartículas de TiO_2 , não apresentaram um aumento nos danos observados no material genético (FIGURA 42 – d, e, f).

Ensaio cometa cérebro

No conjunto de análises (a) podemos perceber que o grupo exposto ao alumínio não causou danos ao material genético das brânquias frente ao controle negativo (FIGURA 43 – a). Já para os conjuntos de análises (b) e (c), os resultados foram semelhantes. No conjunto de análises (b), que avalia os três grupos expostos às nanopartículas em relação ao controle negativo, foi possível verificar um aumento nos danos ao material genético para as três concentrações de nanopartículas utilizadas neste experimento ($p < 0.0001$). Além disso, essas concentrações mostraram um nível de dano similar ao grupo controle positivo (FIGURA 43 – b). Para o conjunto de análise (c), que avalia os três grupos expostos à associação dos contaminantes em relação ao controle negativo, os três grupos (Al+0,1 NP; Al+1 NP e Al+ 10 NP) apresentaram diferenças em relação ao controle negativo e não possuíram diferenças entre si ($p < 0.0001$) (FIGURA 43 – c). Quando analisamos as respostas dos conjuntos de análise (d), (e) e (f), verificamos o mesmo tipo de resposta para os três conjuntos de análise, de forma similar às respostas observadas no ensaio cometa em eritrócitos, brânquias e fígado: os grupos expostos apenas ao metal alumínio e à associação do alumínio com as nanopartículas de TiO_2 , não apresentaram diferenças com relação aos danos no material

genético, porém os grupos expostos apenas às nanopartículas de TiO_2 , todos as concentrações (0,1 NP, 1 NP e 10 NP) apresentaram um aumento nos danos observados no material genético ($p < 0.0001$) (FIGURA 43 – d, e, f).

FIGURA 29 - DANOS AO DNA DO RIM POSTERIOR DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. AI: ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (AI+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (AI+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (AI+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

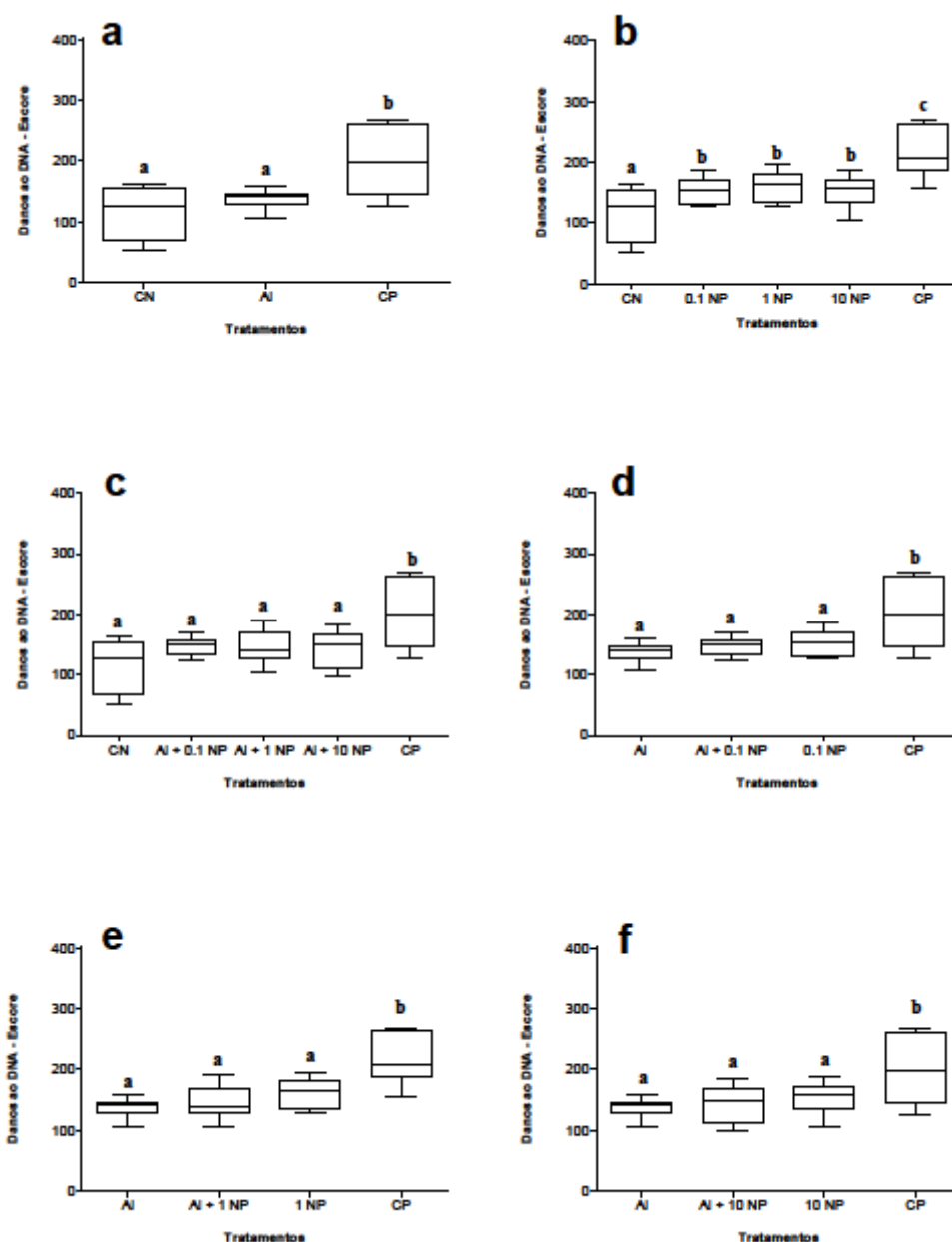
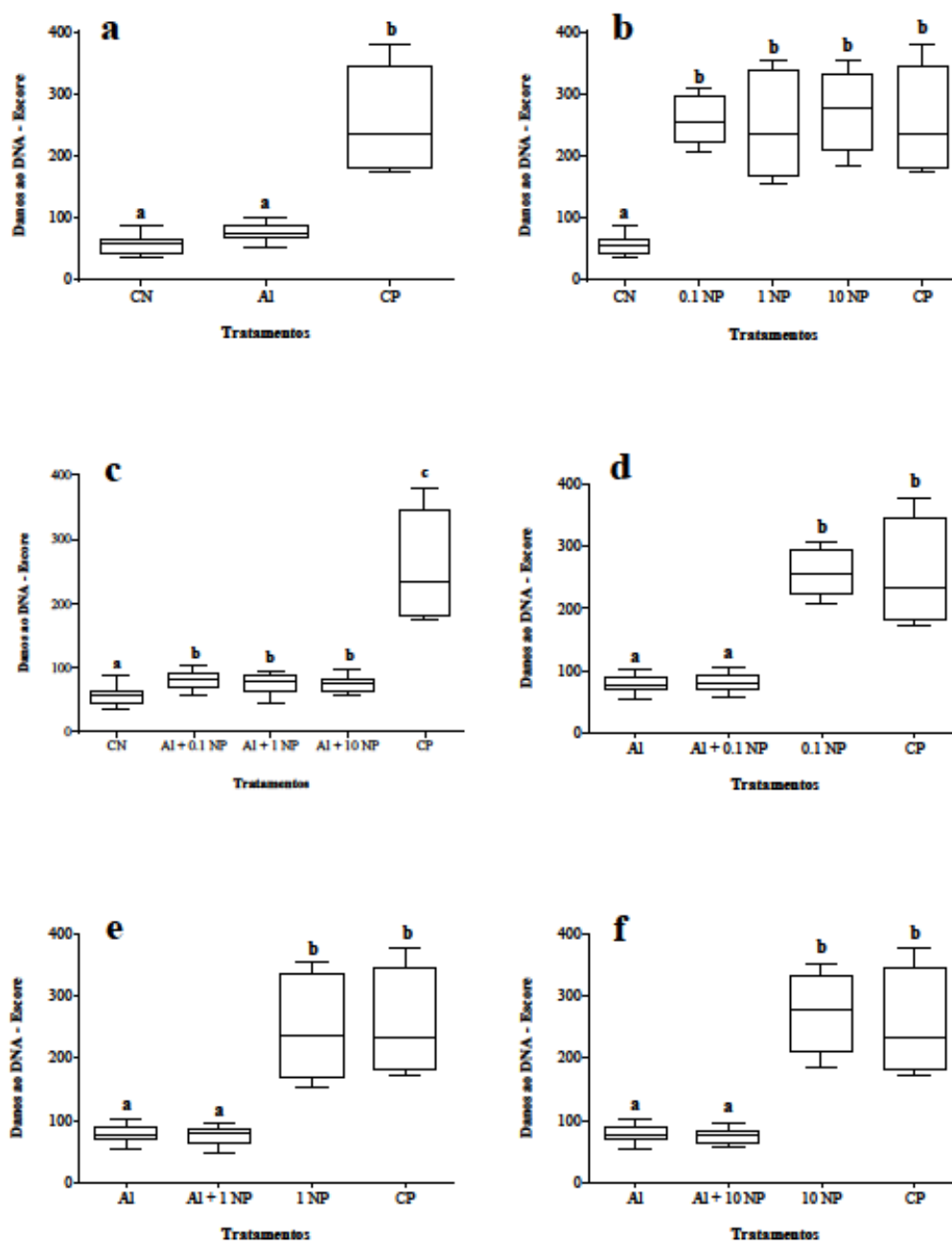


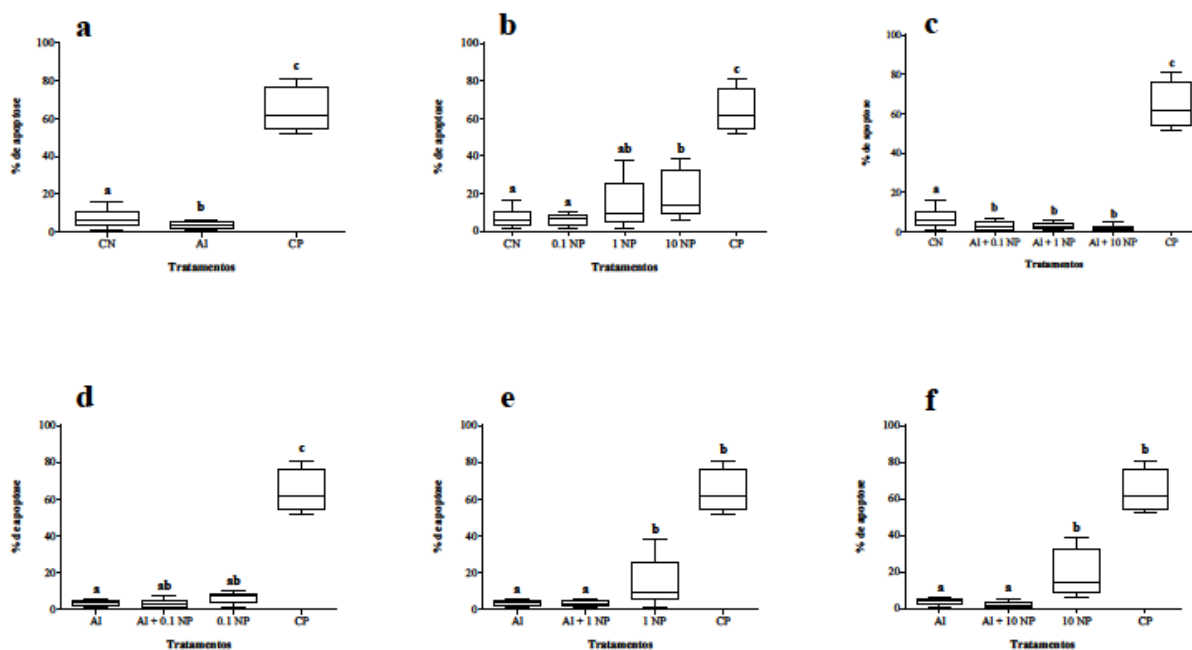
FIGURA 30 - DANOS AO DNA ENCONTRADOS NO CÉREBRO DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO COMETA. Al: ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Al+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Al+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.



Ensaio de difusão do DNA em eritrócitos

A análise do ensaio de difusão do DNA em eritrócitos mostrou que o grupo exposto ao alumínio apresentou uma frequência menor de células em apoptose, quando comparado ao grupo controle negativo (conjunto de análises a) (FIGURA 44 – a). Para o conjunto de análises (b), que avalia a frequência de apoptose dos grupos expostos às nanopartículas em relação ao grupo controle negativo, os grupos expostos às concentrações de 1 NP e 10 NP, as duas maiores concentrações de TiO_2 , apresentaram uma maior frequência de células em apoptose (FIGURA 44 - b). Para o conjunto de análises que avalia os grupos expostos às associações entre os contaminantes (c), todos os grupos expostos à associação apresentaram uma frequência menor de apoptose em relação ao controle negativo, porém eles não apresentaram diferenças nestas frequências entre si (FIGURA 44 - c). Para os conjuntos de análise (d), (e) e (f), que avaliam a frequência de apoptose dos grupos de exposição à combinação de contaminantes em relação aos grupos expostos aos contaminantes de forma isolada, as respostas foram semelhantes para os grupos (e) e (f), porém foram diferentes para o conjunto de análises (d). Este conjunto não apresentou diferenças nas frequências de apoptose entre os três grupos analisados. Para os conjuntos de análise (e) e (f), os grupos expostos apenas ao alumínio e à associação entre os contaminantes (Al+1 NP) e (Al+10 NP), respectivamente para cada conjunto, não apresentaram diferenças na frequência de apoptose, diferentemente do que foi observado para os grupos expostos apenas às nanopartículas de TiO_2 nestes grupos de análise, que apresentaram um aumento da frequência de apoptose, em relação aos outros grupos de análise ($p < 0.0001$) (FIGURA 44 – d, e, f)

FIGURA 31 - FREQUÊNCIA DE APOPTOSE ENCONTRADA EM ERITRÓCITOS DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA. Al: ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Al+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Al+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.

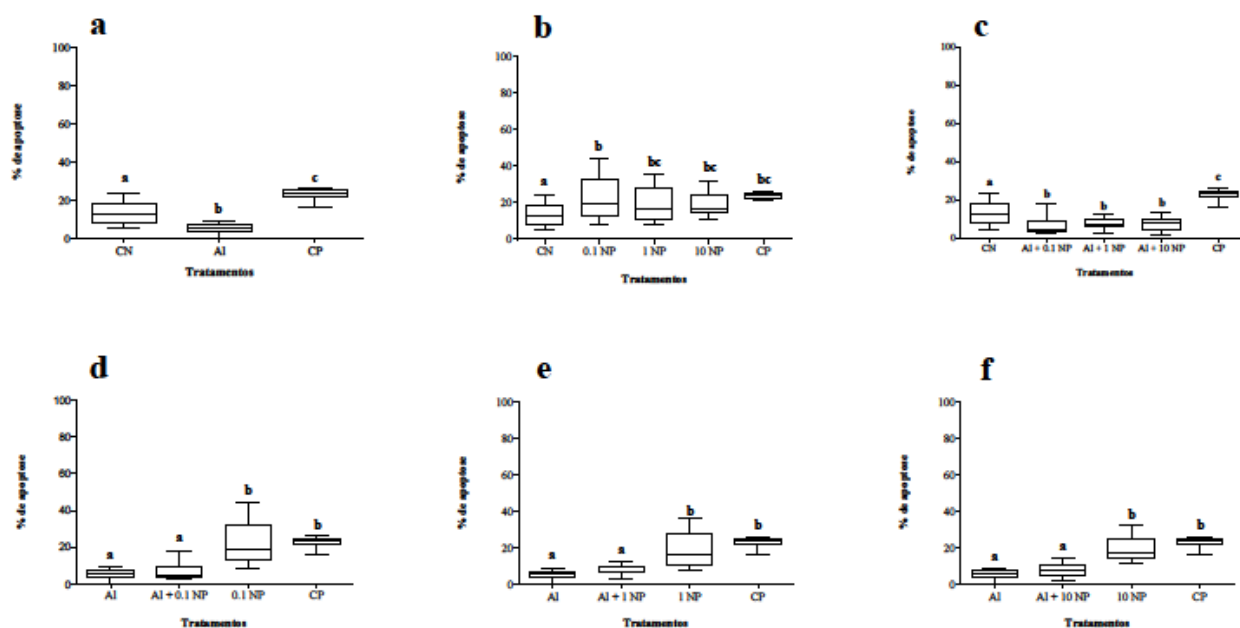


Ensaio de difusão do DNA no fígado

A análise do ensaio de difusão do DNA em células do fígado mostrou que o grupo exposto ao alumínio apresentou uma frequência menor de células em apoptose, quando comparado ao grupo controle negativo (conjunto de análises a) (FIGURA 45 – a). Para o conjunto de análises (b), que avalia a frequência de apoptose dos grupos expostos às nanopartículas em relação ao grupo controle negativo, os grupos expostos às três concentrações de nanopartículas de TiO_2 (0,1 NP, 1 NP e 10 NP), as três concentrações de TiO_2 , apresentaram uma maior frequência de células em apoptose, porém esta frequência não apresentou diferenças entre os três grupos ($p = 0.0017$) (FIGURA 45 - b). Para o conjunto de análises que avalia os grupos expostos às associações entre os contaminantes (c), todos os grupos expostos à associação apresentaram uma frequência menor de apoptose em relação ao controle negativo, porém eles não apresentaram diferenças nestas frequências entre si (FIGURA 45 - c). Para os conjuntos de análise (d), (e) e (f), que avaliam a frequência de apoptose dos grupos de exposição à combinação de contaminantes em relação aos grupos expostos aos contaminantes de forma isolada, as respostas foram semelhantes para os três

conjuntos de análise. Para estes conjuntos, os grupos expostos apenas ao alumínio e à associação entre os contaminantes (Al+0,1 NP, Al+1 NP e Al+10 NP), respectivamente para cada conjunto, não apresentaram diferenças na frequência de apoptose, diferentemente do que foi observado para os grupos expostos apenas às nanopartículas de TiO_2 pois, nestes grupos de análise foi possível identificar um aumento da frequência de apoptose, em relação aos outros grupos de análise ($p < 0.0001$), frequência esta similar à encontrada pelo grupo controle positivo (FIGURA 45 – d, e, f)

FIGURA 32 - FREQUÊNCIA DE APOPTOSE ENCONTRADA EM CÉLULAS DO FÍGADO DE *Hoplias intermedius*, DETECTADOS POR ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA. Al: ALUMÍNIO (50 $\mu\text{g/g}$); ASSOCIAÇÃO DE ALUMÍNIO COM AS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO, NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (Al+0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (Al+1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (Al+10 NP). NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1 $\mu\text{g/g}$ (0.1 NP), 1 $\mu\text{g/g}$ (1 NP), 10 $\mu\text{g/g}$ (10 NP). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS EM MEDIANAS E QUARTIS. LETRAS MINÚSCULAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($p < 0,05$) ENTRE OS TRATAMENTOS.



DISCUSSÃO

A nanotecnologia trata do desenvolvimento e utilização de compostos que possuem um tamanho menor do que 100 nm, com o objetivo de aumentar de forma significativa a área de superfície, fazendo com que haja um aumento também da atividade catalítica e reativa destes materiais. A entrada de nanopartículas no ambiente aquático é em sua maioria devido aos efluentes industriais ou de fontes domésticas. Efluentes de fontes domésticas incluem produtos de consumo (protetores solares e cosméticos), tanto por via direta (por exemplo, tomar banho) e por via indireta (esgoto), lixiviação de aterros ou lodo de esgoto aplicado ao solo e fontes atmosféricas provenientes da queima de resíduos (OWEN e DEPLEDGE, 2005). Dado que as indústrias de nanotecnologia aumentam a sua produção em grande escala, é inevitável que esses produtos e seus subprodutos vão se acumular no ambiente aquático (MOORE, 2006; DAUGHTON, 2004) e seus potenciais efeitos genotóxicos poderiam ter consequências a curto e em longo prazo para a biota (JHA, 2004). A utilização de testes toxicológicos de curto prazo, principalmente os de cunho genético, são ferramentas muito úteis para determinar a toxicidade destes compostos, bem como o efeito no material genético das células, gerando informações que possibilitem a identificação do potencial carcinogênico e consequente proteção da saúde pública e do meio ambiente.

As nanopartículas de TiO_2 foram consideradas, em um primeiro momento, biologicamente inertes aos animais e aos seres humanos e por este motivo, são amplamente utilizadas como ingredientes tintas de coloração branca, corantes de alimentos, filtros solares e produtos cosméticos. Porém, a existência de informações contraditórias a respeito dessas nanopartículas, aumentou a preocupação com relação ao seu uso em produtos de consumo humano. Deste modo, no presente estudo investigou-se o potencial genotóxico e citotóxico das nanopartículas de TiO_2 , bem como sua associação ao íon metálico alumínio, utilizando a espécie *Hoplias intermedius*, popularmente conhecida como traíra (Characiformes, Erythrinidae), como bioindicador. Existem evidências de efeitos de entrega de metais, pelas nanopartículas, quando o metal está presente como um co-contaminante com as mesmas. Este processo está relacionado à habilidade dos metais em adsorverem a superfície de algumas nanopartículas negativamente carregadas (HANDY *et al.*, 2008b). Muitas nanopartículas possuem cargas negativas (superfícies aniônicas) em águas naturais e a possibilidade de as nanopartículas aumentarem a toxicidade dos metais, como veículos ou em misturas ainda requerem mais estudos.

Devido à importância da caracterização das nanopartículas utilizadas antes de cada experimento de toxicidade (MURDOCK *et al.*, 2008), o tamanho das partículas e forma, bem como a composição e área de superfície, e também para as suspensões, características como o estado de agregação, o índice de polidispersão e o potencial zeta foram determinados com as mais diversas técnicas. Uma avaliação da extensão da agregação é crítica, pois um pequeno número de agregados pode, de maneira eficaz, esgotar a concentração disponível de nanomateriais não agregados (e potencialmente tóxicos) de nanopartículas (WISE SR *et al.*, 2010), apesar de já estar descrito na literatura a capacidade de aglomerados de nanopartículas serem internalizados pelas células, por mecanismos diferentes das nanopartículas individualizadas (KETTIGER *et al.*, 2013).

A concentração de alumínio no músculo dos peixes mostrou resultados surpreendentes, pois estão muito acima dos níveis de detecção. Como anteriormente citado, o sulfato de alumínio é muito utilizado em grandes quantidades no tratamento de água e este pode ser uma das razões pelas quais foi possível verificar uma grande concentração de alumínio nos tecidos dos peixes, mesmo no controle negativo, visto que nenhum nível máximo aceitável está estabelecido (WAUER *et al.*, 2004).

Um desafio para os estudos em nanogenotoxicologia é a elaboração e utilização de controles positivos específicos para estes estudos (HUK *et al.*, 2015). Neste trabalho utilizamos o metilmetanosulfonato (MMS) como controle positivo, porém este não foi eficiente para o Teste de Micronúcleo Písceo (MNP) e Alterações Morfológicas Nucleares (AMN). O MMS é um agente alquilante e conhecido pelo seu potencial genotóxico (SUZUKI *et al.*, 2005) sendo muito utilizado como controle positivo para análises dos efeitos de poluentes ambientais (FABBENDER e BRAUNBECK, 2013). A razão pela qual houve uma baixa indução do número de micronúcleos, após uma exposição intraperitoneal de MMS, não é conhecida. Porém, uma explicação poderia estar relacionada a uma elevada taxa de citotoxicidade em 24 horas, impossibilitando a visualização de eritrócitos alterados. Provavelmente, o MMS necessitaria de um tempo de exposição prolongado para causar danos ao DNA das células eritrocitárias e para isso, haveria a necessidade de um tempo maior de exposição *in vivo*, para que ocorresse uma ativação metabólica completa do contaminante, e a visualização de danos a estas células. Esta falta de indução significativa de micronúcleos foi também observada por Winter *et al.*, (2007) e também por Monteiro *et al.* (2011), porém ambos utilizaram o composto ciclofosfamida como controle positivo, durante períodos semelhantes em diferentes espécies de peixes: *Pimephales promelas* e *Prochilodus lineatus*, respectivamente.

A indução de lesões nucleares por agentes genotóxicos pode ser mascarada através de uma ação citotóxica, como relatado no parágrafo anterior e por Das e Nanda (1986) e Brunetti *et al.* (1988), que mata os eritrócitos em vez de formar lesões celulares não letais, um dos motivos pelos quais possivelmente não foi possível verificar neste trabalho diferenças significativas entre os conjuntos de análise (a), (b) e (c), quando foi utilizado o teste do micronúcleo písceo e de alterações morfológicas nucleares. Para os conjuntos de análise (d), (e) e (f), quando analisamos o total de alterações morfológicas nucleares, também não observamos alterações significativas do número de alterações nos grupos expostos às combinações de contaminantes em relação aos contaminantes de forma isolada. Galindo *et al.*, 2010, após avaliar os efeitos causados pela exposição ao alumínio sobre espécie *Prochilodus lineatus*, utilizando o teste do micronúcleo písceo e alterações morfológicas nucleares, verificaram que as frequências de micronúcleos foram muito baixas e não aumentaram significativamente depois da exposição ao alumínio porém as alterações morfológicas nucleares aumentaram significativamente depois dos períodos de exposição agudos (6, 24, 96h) e crônico (15 dias), realizados no experimento. O aparecimento de lesões nucleares é afetado por uma variedade de fatores, tais como a eritropoiese e o tempo necessário para a maturação e a longevidade dos eritrócitos (UDROIU, 2006). Uma diminuição gradual na frequência de MN com um aumento do período de exposição, bem como a maior concentração dos agentes genotóxicos foi encontrada por Das e Nanda (1986), e explicado por um efeito inibitório sobre a divisão celular e subsequente impedimento na passagem das células afetadas para a circulação periférica (NEPOMUCENO *et al.*, 1997). Este efeito pode ser resultado tanto da inibição da síntese do DNA (WILLIAMS e METCALFE, 1992) quanto da inibição direta da eritropoiese (DINNEN *et al.*, 1988) causada por vários agentes genotóxicos, em certas concentrações, e considerado como uma propriedade citotóxica dos xenobióticos (UDROIU, 2006). Todos estes fatores devem ser cuidadosamente considerados, pois eles podem ser a base para um falso negativo.

Para as análises das quantidades de micronúcleos, bem como das alterações morfológicas nucleares separadamente, os resultados foram esclarecedores apenas para alguns casos. Quando consideramos o total de alterações, as análises de micronúcleos, e as análises de alterações do tipo *blebbed* e binúcleo, separadamente, nenhuma destas apresentou resultados significativos, enquanto que, apenas alguns conjuntos de análise, as alterações do tipo *notched*, *vacuolated* e *lobed* apresentaram algumas diferenças significativas apenas para alguns grupos. Informações específicas relacionadas ao mecanismo de formação e mensuração das anormalidades nucleares são escassas, tornando difícil a comparação dos

resultados de diferentes laboratórios. Apesar de algumas divergências, parece ser consensual que os problemas de segregação aliados à união cromossômica ou amplificação gênica por meio de ciclos de quebra-fusão-ponte poderiam causar gomos nucleares (NB) (núcleos *lobed* e *blebbed*) durante a eliminação de DNA amplificado a partir do núcleo (TOLBERT *et al.*, 1992; SHIMIZU *et al.*, 1998, 2000), porém neste estudo, eles não apresentaram o mesmo tipo de resposta, para os mesmos grupos. De acordo com Serrano-Garcia e Montero-Montoya (2001), os fenômenos de brotação dos núcleos celulares e de células bi-nucleadas têm uma origem semelhante com os MN e se supõem ser decorrentes de agentes genotóxicos. Além disso, uma relação positiva e significativa entre MN e indução de núcleos *lobed* e *blebbed* foi encontrada por vários autores (FERRARO *et al.*, 2004; BOLOGNESI *et al.*, 2006; ERGENE *et al.*, 2007; RAMSDORF *et al.*, 2008), sugerindo que a formação de NB nos eritrócitos pode ser útil para uma análise complementar da avaliação da genotoxicidade em peixes. Além disso, segundo HAYASHI *et al.* (1998), o teste do micronúcleo realizado com células de brânquias mostrou-se mais sensível que os eritrócitos, concordando com Çavas, Garanko e Arkhipchuk (2005c) que também relatam sensibilidade maior de células de brânquias e de fígado, em relação às do sistema eritrocitário. Além disso, células circulantes anormais tendem a ser removidas pelo organismo mais rapidamente do que aquelas não danificadas (DAS e NANDA, 1986), informação que foi corroborada pela ocorrência de hemossiderose esplênica concomitantemente com a expressão de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos, como descritos por Pacheco e Santos (2002). Para os grupos expostos apenas às nanopartículas, os dados da literatura para estudos *in vivo* que utilizam o teste do micronúcleo pístico são escassos e este teste parece ser mais utilizado em estudos de cultivo celular em células de mamíferos.

Do ponto de vista ecotoxicológico, informações relacionadas à dieta e à taxa de entrada de nanomateriais, a transferência via trófica de nanomateriais e os efeitos crônicos das nanopartículas no crescimento são interesses de fundamental importância. Ramsden *et al.* (2009) não apenas relata a ausência de efeitos no crescimento de *O. mykiss*, com exposições acima de 100 mg/kg de nanopartículas de TiO₂, mas também relata distúrbios bioquímicos e nos marcadores de estresse oxidativos, nos eletrólitos e na bomba de Na⁺ K⁺ ATPase. Ramsden *et al.* (2009) discute ainda que estes efeitos são amplamente similares aos efeitos visualizados em alguns metais, como o Cu e o Cd (CLEARWATER *et al.*, 2002; HANDY *et al.*, 2005). Estes dados suportam a noção de que os nanomateriais poderiam produzir efeitos tóxicos sutis semelhantes para sais de metais na dieta, sem comprometer o crescimento.

Notavelmente, Ramsden *et al.* (2009) compararam os resultados para nanopartículas de TiO₂ contra o risco conhecido de outros metais, e argumentaram que, com base nos efeitos subletais, sem inibição do crescimento, o perigo das nanopartículas de TiO₂ na dieta, foi semelhante ao mercúrio em doses orais equivalentes.

Os mecanismos para a entrada de metais nas células, atravessando as membranas biológicas envolvem o transporte mediado por carreadores de membranas que fazem o transporte de íons metálicos (BURY *et al.*, 2003; HANDY e EDDY *et al.*, 2004). A questão central é que as nanopartículas são grandes demais para usar transportadores de íons nas membranas celulares, ou vias paracelulares de difusão, e que a rota mais provável de entrada nas células seria por vias de endocitose. A grande parte das evidências leva a este raciocínio e, se este se mostrar verdadeiro, será necessária uma reconsideração das suposições básicas para a captação dos metais pelas células, e será necessário revê-los para os nanomateriais metálicos. Para os metais dissolvidos, a biodisponibilidade é assumida como sendo uma função de especiação do metal, uma vez que apenas certas espécies metálicas se encaixam a via de transporte de íons relevantes, e a difusão de íons metálicos através do núcleo hidrofóbico de membranas, parece não ocorrer (CAMPBELL e STOKES, 1985; CAMPBELL, 1995; ESCHER e SIGG, 2004).

No entanto, se o nanometal dissolve para liberar íons livres, em seguida, também se aplicam os modelos atuais de captação existentes para os metais. Alguns dos eventos apicais, tais como o papel protetor do muco, que parece igualmente adequado para as nanopartículas (HANDY *et al.*, 2008b). Semelhante aos íons metálicos, o local de absorção (por exemplo, brânquias e intestino) também poderiam ser órgãos-alvo para os efeitos tóxicos. Algumas nanopartículas são tóxicas para os processos respiratórios em peixes e produzem patologias nas brânquias que são semelhantes às produzidas por íons metálicos (FEDERICI *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2007). Ainda de forma semelhante aos metais que atuam na superfície (por exemplo, Al, HANDY e EDDY, 1989), continua sendo possível que algumas nanopartículas possam exercer efeitos tóxicos, sem absorção significativa do metal para os órgãos internos (por exemplo, exposições hídricas agudas a nanopartículas de TiO₂, FEDERICI *et al.*, 2007).

Para o ensaio cometa realizado em eritrócitos, o conjunto de análise (a) mostrou que o grupo exposto ao alumínio apresentou um decréscimo nos danos evidenciados pelo ensaio cometa, em relação ao grupo controle negativo. Galindo *et al.* 2010, após avaliar os efeitos causados pela exposição ao alumínio sobre espécie *Prochilodus lineatus*, após exposição aguda (6, 24 e 96h) e crônica (15 dias), utilizando o ensaio cometa em eritrócitos, relatou a

ocorrência de resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, para a exposição crônica. Galindo *et al.* 2010 avaliou esta resposta como sendo transitória, uma vez que os danos presentes nas células podem ser reparados, através do mecanismo de excisão de bases ou de nucleotídeos (AMADO *et al.*, 2006). Alguns estudos apontam que, em peixes, a expressão gênica pode ser modulada por exposição a agentes genotóxicos químicos ou físicos, como por exemplo, neste caso, estariam os metais, poluentes orgânicos, bem como compostos estrogênicos ou que mimetizam este comportamento. Entretanto, a modulação da expressão gênica parece ser tecida específica e varia com o tempo de exposição ao contaminante, e neste caso, explicaria a redução observada dos danos no DNA (KIENZLER *et al.*, 2013). Para o conjunto de análise (b) que avaliou os grupos expostos às nanopartículas, todos os grupos apresentaram danos similares, e maiores do que os danos observados no controle negativo. Efeitos tóxicos das nanopartículas no sangue de peixes continuam a ser investigados. No entanto, para as nanopartículas de TiO_2 , não parece ocorrer grandes perturbações para contagem de células de sangue ou eletrólitos do plasma em truta arco-íris (FEDERICI *et al.*, 2007) e nenhuma evidência de peroxidação lipídica (ensaio TBARS) no plasma sanguíneo, em truta arco-íris, após a administração intravenosa dessas nanopartículas, foi verificada (SCOWN *et al.*, 2009). Os efeitos de outros nanomateriais na hematologia de peixes, em células do sistema imunológico, e na bioquímica do plasma ainda não foram relatados. O conjunto de análise (c) demonstrou uma diminuição no dano genético encontrado nos grupos de co-exposição entre as nanopartículas e os metais, em relação ao controle negativo. Esta diminuição do dano genético fez com que o padrão encontrado fosse muito parecido ao grupo exposto apenas ao alumínio, para todos os outros conjuntos de análise (d, e, f), o que nos leva a perceber uma interferência no dano encontrado, de acordo com a existência ou não do metal alumínio durante a exposição.

Para o ensaio de difusão do DNA em eritrócitos, os resultados se mostraram concordantes com os encontrados pelo ensaio cometa em eritrócitos. Para o grupo exposto ao alumínio, a frequência de apoptose diminuiu, do mesmo modo que os danos ao DNA também diminuíram, como verificado pelo ensaio cometa. Porém, se analisarmos o conjunto de análise (b) perceberemos uma diferença na resposta de um dos grupos expostos às nanopartículas de TiO_2 : o grupo exposto à menor concentração de nanopartículas não apresentou diferenças na frequência de apoptose, em relação ao grupo controle negativo, e nem quando comparado com o grupo exposto à associação de contaminantes (conjunto de análise d). Os outros dois grupos expostos às duas maiores concentrações de nanopartículas de TiO_2 apresentaram uma maior frequência de apoptose, inclusive com relação aos grupos expostos à associação de

contaminantes (conjuntos e, f). Novamente, os grupos de co-exposição aos contaminantes mostraram uma resposta diferente e foi possível verificar uma diminuição da frequência de apoptose para os três grupos, de forma semelhante. Nestas análises, fica clara a existência de uma interação entre as nanopartículas de TiO₂ e o metal alumínio, porém para o ensaio de difusão do DNA não existem dados na literatura que específicos para nanopartículas que possam ser utilizados na tentativa de elucidar o mecanismo de interação e os resultados apresentados neste trabalho.

No ensaio cometa realizado com as brânquias de *Hoplias intermedius*, o padrão de resposta encontrado foi muito semelhante à resposta do ensaio cometa em células eritrocitárias. Nas brânquias, o cenário típico após uma exposição hídrica aos metais envolve alguns efeitos diretos sobre as funções das brânquias (McDONALD e WOOD, 1993; PERRY e LAURENT, 1993). Estas podem incluir alterações osmorregulatórias (por exemplo, Cd, MCCARTY e HOUSTON, 1975; GILES, 1984; Cu, Taylor *et al.*, 1996), na função ácido-base, ou em funções respiratórias das brânquias (por exemplo, Ni, Pyle *et al.*, 2002). Patologias sub-letais nas brânquias podem ser reflexo de alterações nas secreções mucosas, refletindo um aumento das células de cloreto no epitélio (por exemplo, MALLATT, 1985), ou evidências de edema no epitélio (SOLÉ *et al.*, 1995; CAMPBELL *et al.*, 1999). As alterações histológicas no epitélio branquial também estão associadas com alterações bioquímicas adaptativas, em resposta à exposição ao metal (por exemplo, indução das metalotioneínas nas brânquias (DANG *et al.*, 1999). Os metais também podem inibir a Na⁺/K⁺-ATPase branquial (Cu; LI *et al.*, 1998). Outros mecanismos de toxicidade respiratória também são possíveis com metais e, por exemplo, o excesso de ferro (independentemente de bioacumulação) pode resultar em flocos de ferro nas brânquias, que pode entupi-las resultando em desconforto respiratório (PEURANEN *et al.*, 1994; DALZEL e MACFARLANE, 1999). Isso também pode ser altamente relevante para outras partículas, tais como nanopartículas metálicas, mas uma quantidade maior de dados precisa ser coletada sobre esse aspecto. Para ensaios tróficos, a escassez de dados acerca dos efeitos das nanopartículas nas brânquias deve ser evidenciado, assim como a escassez de informações acerca dos efeitos nas brânquias de peixes após uma exposição via dieta. Em relação ao alumínio, diversos autores o consideram tóxico para as brânquias, utilizando mecanismos que envolvem a regulação iônica e a respiração, ou uma mistura de ambos (HANDY *et al.*, 2011).

Ambos, fígado e rim funcionam como órgãos excretadores para substâncias exógenas em peixes, e a habilidade desses órgãos em excretar nanomateriais são discutidas no trabalho de Handy *et al.* (2008b). O fígado é o principal local de biotransformação nos animais, e o rim é

o principal órgão hematopoiético nos peixes. O fígado pode transformar em compostos prejudiciais alguns metabólitos que são excretados diretamente na bile para continuar a desintoxicação. Quando um composto é excretado na bile, ele posteriormente vai para o intestino.

No ensaio cometa realizado em células do fígado, novamente o grupo exposto somente ao metal alumínio não apresentou diferenças em relação ao grupo controle negativo. Para o conjunto de análises (b), os grupos expostos às nanopartículas não apresentaram diferenças com relação ao grupo controle negativo e o mesmo aconteceu para o grupo de análise (c), cujos grupos expostos à co-exposição dos contaminantes não apresentou diferenças em relação ao grupo controle negativo. Já os conjuntos de análise (d), (e) e (f), apresentaram respostas similares aos outros dois tecidos analisados (sangue e brânquias), com os grupos expostos apenas às nanopartículas apresentando com uma maior quantidade de danos, do que quando em associação ao metal alumínio, mostrando novamente que existe uma possível interação dessas partículas com o metal alumínio. Neste caso, estudos sobre o metabolismo e a excreção de nanopartículas manufaturadas são limitados por razões técnicas. Entretanto, é válido considerar se existem razões fundamentais para que estes processos sejam diferentes para nanopartículas manufaturadas em comparação a outras substâncias.

Se analisarmos os resultados encontrados para o ensaio cometa de fígado e rim simultaneamente, veremos a diferença entre as respostas obtidas e estas podem estar relacionadas ao modo de excreção das nanopartículas. O ensaio cometa realizado com as células do rim posterior, mostrou resultados diferentes do ensaio cometa realizado com o fígado. O conjunto de análise (a) novamente não mostrou diferenças significativas do dano encontrado no DNA em relação ao controle negativo, porém o conjunto de análise (b) que compara os grupos expostos às três concentrações de nanopartículas de TiO_2 mostrou um aumento dos danos ao DNA quando comparado ao controle negativo. Já o conjunto de análise dos contaminantes co-expostos em relação ao controle negativo (c), neste caso, também não mostrou diferenças significativas nos danos ao DNA para os três grupos. Os peixes podem excretar substâncias pelo sangue, através do fígado, rim, brânquias e também através do muco corporal (de origem intracelular). Uma hipótese para a excreção, utilizando o sangue é que a substância deva estar na fase aquosa, ao invés de ligada à superfície externa de um eritrócito, ou ligada a proteínas do plasma. Esta hipótese é baseada no fato que as células e as proteínas do plasma são usualmente retidas no sangue, enquanto que o contaminante de interesse aparece na urina ou na bile. O problema real é se as nanopartículas manufaturadas podem passar através das células do fígado para a bile ou podem ser filtradas pelo rim. A excreção

hepática depende de exocitose e do tráfego de vesículas para formar a bile, e levando-se em consideração estas vesículas, que podem ter cerca de 200 nm (HAMPTON *et al.*, 1988), é possível que, pelo menos para partículas primárias com dimensões inferiores a esta, ocorra a entrada de nanopartículas nas vesículas. Porém, os resultados verificados por este trabalho mostram um maior dano dos grupos expostos às nanopartículas frente aos grupos expostos apenas ao alumínio ou ao alumínio associado às nanopartículas para as células do fígado, fato que não ocorre com o ensaio cometa das células do rim (grupos d, e, f), mostrando que possivelmente existe um mecanismo envolvido na interação desses compostos e possivelmente no modo de excreção quando estas nanopartículas encontram-se ou não associadas aos metais.

Os resultados obtidos para o ensaio de difusão do DNA em células do fígado mostram o grupo exposto ao metal alumínio apresentando uma diminuição da frequência de apoptose (conjunto de análise a), que se mostrou aumentada nos grupos expostos às nanopartículas de TiO₂, nas três concentrações utilizadas neste experimento (conjunto de análise b). Novamente, os três grupos expostos aos contaminantes de forma associada mostraram uma resposta diferente, mostrando uma diminuição da frequência de apoptose nestes grupos, frente ao controle negativo (conjunto de análise c). Já para os outros conjuntos de análise (d, e, f), novamente a resposta se assemelhou a outros tecidos deste experimento, porém, se consideramos apenas o fígado, além de um número de danos ao DNA maior evidenciado pelo ensaio cometa nos grupos expostos apenas às nanopartículas, o ensaio de difusão do DNA também corroborou estas análises, pois os grupos expostos às nanopartículas de TiO₂ apresentaram uma maior frequência de apoptose, em relação aos grupos expostos apenas ao alumínio e à associação destes contaminantes. Possivelmente exista uma relação entre os danos encontrados e o mecanismo de excreção dessas nanopartículas quando associadas ao não aos metais, neste caso, o alumínio. Os peixes também podem mostrar alterações patológicas sutis no fígado, como por exemplo, na quantidade de ácidos graxos e em focos de necrose (HANDY *et al.*, 1999) e evidências de estresse oxidativo transitórias (BAKER *et al.*, 1998; BERNTSSEN *et al.*, 2000; HOYLE *et al.*, 2007). Os efeitos osmorregulatórios de exposição ao metal na dieta são muito menos graves do que por via aquosa, embora perturbações no tecido que foram classificados como sendo graves ou muito graves já tenham sido observados.

Neste estudo, a maioria dos marcadores bioquímicos de estresse oxidativo, de biotransformação, de danos em macromoléculas e concentração de metalotioneínas foram

realizados para o fígado, pois este é o principal local de biotransformação nos animais, e está diretamente relacionado ao processo de desintoxicação dos mesmos.

Para a enzima superóxido dismutase (SOD), não foi verificado um aumento da atividade da enzima para o grupo exposto ao alumínio, enquanto que para os grupos expostos às nanopartículas foi verificado um aumento da atividade desta enzima para as três concentrações de nanopartículas utilizadas neste experimento. Quando analisamos o grupo exposto à associação das nanopartículas de TiO_2 com o metal alumínio, os grupos expostos às menores concentrações de nanopartículas sofreram uma diminuição da atividade da SOD. Para os conjuntos de análise que avaliam a interação das nanopartículas com o metal (d, e), os dois grupos co-expostos às duas menores concentrações de nanopartículas de TiO_2 com o metal alumínio, mostraram uma diminuição da atividade da SOD em relação aos grupos expostos aos contaminantes de forma isolada. Para o conjunto de análise (f), houve um aumento da atividade da enzima SOD no grupo exposto apenas à nanopartícula de forma isolada.

Ao considerarmos a enzima catalase (CAT) também nesta análise, esta enzima aumentou sua atividade no grupo exposto apenas ao alumínio, o que não ocorreu para todos os outros grupos deste experimento (conjunto de análise b, c), em relação ao controle negativo. Para os conjuntos de análise (d), (e) e (f), foi possível verificar uma diminuição da atividade desta enzima, quando os grupos foram expostos às duas menores concentrações de nanopartículas de TiO_2 , isoladas ou quando em associação com o metal, com exceção do último grupo, no qual a inibição ocorreu apenas para o grupo exposto à nanopartícula de TiO_2 (10 NP). Distúrbios bioquímicos em órgãos internos têm sido relatados em vários estudos, e em particular, o estresse oxidativo está aparecendo de forma recorrente como um mecanismo potencial de toxicidade das nanopartículas. Apesar de alguns estudos não apresentaram mudanças nestas enzimas, outros descreveram aumentos ou decréscimos nas atividades da enzima antioxidante catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), e glutathione peroxidase (GPx) em organismos aquáticos expostos às nanopartículas de TiO_2 (CLEMENTE *et al.*, 2013).

O mecanismo de estresse oxidativo, bem como a indução das enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes, é bem conhecido para os metais dissolvidos, como por exemplo, indução pelo Cd da glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) no músculo dos peixes (ALMEIDA *et al.*, 2002) e indução pelo Cu de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (SANCHEZ *et al.*, 2005). Alguns nanomateriais também podem causar estresse oxidativo. Por exemplo, Federici *et al.* (2007) expôs juvenis de truta arco-íris à 1,0

mg/L de nanopartículas de TiO₂ durante 14 dias, o que causou um aumento em substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, um indicador da peroxidação lipídica) nas brânquias, fígado e cérebro, juntamente com aumento de glutathione total (GSH) nas brânquias e diminuição da GSH, no fígado. Após a exposição a 50 ou 500 µg/L à *quantum dots*, níveis elevados de glutathione oxidada foram observados nas brânquias de *Gasterosteus aculeatus* (SANDERS *et al.*, 2008). Ramsden *et al.* (2009), após exposição trófica de *O. mykiss* às nanopartículas de TiO₂, na concentração de 10 e 100 mg/kg, durante 10 semanas, verificou os níveis de glutathione total (GSH) em brânquias, intestino, fígado e cérebro, porém apenas as brânquias apresentaram diferenças significativas nos níveis desta enzima. Os níveis de glutathione dos outros órgãos analisados permaneceram estáveis durante todo o experimento, não apresentando diferenças nos tratamentos.

Neste trabalho, realizamos a mensuração do nível de GST no fígado, e em relação ao controle negativo, o metal alumínio mostrou uma diminuição do nível de GST, em relação ao controle negativo, porém os grupos expostos apenas às nanopartículas de dióxido de titânio e os grupos expostos à associação destes contaminantes não mostraram diferenças em relação ao grupo controle negativo. Porém, nos conjuntos de análise (d) e (f) foi possível verificar o aumento da atividade da enzima GST para os grupos expostos apenas às nanopartículas de TiO₂ de forma isolada, mas também no grupo exposto à associação destes contaminantes. Para o conjunto de análise (e), apenas o grupo exposto à nanopartícula (1 NP) mostrou um aumento desta enzima, em relação aos outros grupos da análise. CLEMENTE *et al.* (2013) realizaram um estudo com a espécie *Piaractus mesopotamicus*, que foi exposta por 96h a concentrações de 0,1,10 e 100 mg/L de nanopartículas de TiO₂, com e sem a utilização de luz ultravioleta. Para as enzimas de estresse oxidativo CAT, SOD e GST não foram verificadas alterações nestes mecanismos de defesa e então se sugere a utilização de outros biomarcadores que ajudassem a esclarecer o mecanismo de defesa envolvido neste caso. O estresse oxidativo foi também verificado em um estudo expondo o peixe japonês *medaka* às nanopartículas de ferro (LI *et al.*, 2009). Durante o estudo ambos, os embriões e espécimes adultos, experimentaram diminuições, dependentes da concentração do contaminante, da enzima superóxido dismutase (SOD). Em peixes adultos, as diminuições na SOD hepática e cerebral durante os primeiros dias de exposição foram acompanhadas por uma redução da glutathione (GSH) no cérebro. No entanto, os níveis de SOD e GSH foram controlados após 3 dias e não foram observadas diferenças em níveis de malondialdeído (MDA, como um indicador da peroxidação lipídica) no fígado ou no cérebro, durante todo o período de exposição. Isso indica que os peixes adultos foram capazes de se proteger com sucesso contra

o estresse oxidativo através da atividade antioxidante, e que foram então capazes de restabelecer a concentração inicial. Já os embriões desta mesma espécie apresentaram uma resposta diferente em relação à exposição às nanopartículas.

Dessa forma, neste trabalho optamos também pela confecção da EROD, na tentativa de se esclarecer alguns mecanismos que podem estar relacionados à defesa destes organismos às nanopartículas e sua associação com o metal alumínio. As respostas encontradas para a EROD para alguns conjuntos de análise são muito semelhantes ao que encontramos para a GST como é o caso do metal alumínio (a) e os conjuntos que analisam os grupos expostos aos contaminantes de forma isolada com os grupos expostos aos contaminantes de forma associada (d, e, f). O grupo exposto ao metal alumínio mostrou uma diminuição da atividade da EROD e esta resposta pode ser devido à ação direta dos metais em enzimas que possuam o grupamento sulfidrílico (SH), como a EROD, ou então devido a uma ação indireta, através do aumento da produção de EROs (BOZCAARMUTLU e ARINÇ, 2004). Com relação aos três grupos expostos às nanopartículas e que apresentaram aumento de atividade da EROD, em relação ao controle negativo (b), isto pode estar associado a uma ativação do mecanismo de biotransformação, e consequentemente uma via de excreção para as nanopartículas, visto que este ensaio foi realizado com homogenatos do fígado. Para os grupos co-expostos aos contaminantes, apenas o grupo exposto à maior concentração de nanopartículas (Al+10 NP) apresentou um pequeno aumento de atividade da EROD em relação aos outros grupos e ao controle negativo. Poucas informações acerca do metabolismo de nanopartículas em peixes são conhecidas, pois ainda não foi possível determinar se as nanopartículas manufaturadas podem ser estericamente disponíveis para se ligarem às enzimas no retículo endoplasmático hepático (ER), de modo que as citocromo mono-oxigenases (CYP) se tornem ativas e possam desagregar esse material (assumindo que as nanopartículas possam acessar o fígado com um todo).

Ainda, não sabemos se, uma vez associadas ao retículo endoplasmático, as enzimas presentes continuarão a desagregação dos resíduos de superfície sobre as nanopartículas manufaturadas. Isto pode envolver inicialmente, a adição de grupos funcionais de reações de fase 1, mas, eventualmente, elas podem ser metabolizadas para componentes básicos (por exemplo, CO₂ e água) (HANDY *et al.*, 2008). Desta forma, mais estudos relacionado à metabolização e a excreção das nanopartículas se fazem necessários para uma melhor análise e compreensão dos dados.

Outros marcadores têm sido utilizados para um grau inferior em nanoecotoxicologia, mas seu estudo pode ajudar a compreender os mecanismos envolvidos em toxicidade de

nanopartículas. As metalotioneínas (MTs) são proteínas que atuam como agentes quelantes de metal e eliminadoras de radicais livres, de modo que elas desempenham um papel antioxidante e estão envolvidos na homeostase e desintoxicação de metais (VIARENGO *et al.*, 1997). Neste trabalho, o grupo exposto ao metal alumínio mostrou um aumento da concentração de metalotioneínas, em relação ao grupo controle negativo. As metalotioneínas, de maneira geral, estão envolvidas na regulação e desintoxicação de metais como zinco e cobre. A expressão das metalotioneínas pode ser induzida pela exposição a metais, aumentando a tolerância fisiológica de organismos a estes (ANDREWS, 2000). Em relação aos grupos expostos às nanopartículas de TiO_2 , estes não apresentaram diferenças na concentração de metalotioneínas, porém as nanopartículas de TiO_2 podem promover a geração de EROs, mesmo na ausência de UV (FENOGLIO *et al.*, 2009). Já para o conjunto de análises (c), os grupos expostos à associação dos contaminantes, mostraram um aumento das concentrações de metalotioneínas apenas para os grupos expostos ao alumínio e às menores concentrações de nanopartículas. O grupo exposto ao alumínio e à maior concentração de nanopartículas de TiO_2 apresentou uma diminuição da concentração de metalotioneínas. O aumento observado na concentração de metalotioneínas poderia, portanto, estar relacionado com a geração de EROs pelas nanopartículas de TiO_2 , ou à regulação da absorção de metais pelo organismo (CLEMENTE *et al.*, 2013). Os resultados controversos que aparecerem para os demais conjuntos de análise deste trabalho (d, e, f) também podem ser atribuídos ao mesmo motivo explicado acima. Neste caso, mecanismos de defesa que envolva o papel das metalotioneínas podem não ser únicos e por esta razão, serão necessárias novas investigações que considerem a função das metalotioneínas na exposição de diferentes tipos de metais e de nanopartículas metálicas.

Outras conclusões interessantes são os níveis de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, indicativa de danos oxidativos para lipídios e proteínas, respectivamente aumentado (FEDERICI *et al.*, 2007; HAO *et al.*, 2009; XIONG *et al.*, 2011). Para tanto, neste trabalho realizamos apenas o ensaio para mensurar os níveis de peroxidação lipídica que poderíamos encontrar após 70 dias de exposição.

O grupo exposto apenas ao metal alumínio não mostrou alterações na concentração de hidroperóxidos, em relação ao grupo controle negativo. Porém, em relação ao conjunto de análise (b), todos os grupos expostos às nanopartículas apresentaram um aumento da concentração de hidroperóxidos, o que não ocorreu com o conjunto de análise (c) que avalia a exposição dos grupos de co-exposição aos contaminantes e mostrou uma diminuição da concentração de hidroperóxidos do grupo exposto à menor concentração de nanopartículas e

um aumento da concentração de hidroperóxidos do grupo exposto à maior concentração de nanopartículas. Como houve um aumento das metalotioneínas neste grupo, pode-se dizer que esta linha de defesa celular foi suficiente para impedir maiores efeitos em biomoléculas. O mecanismo inverso também é verdadeiro, quando verificamos o grupo Al+10 NP, que mostrou uma diminuição da concentração de metalotioneínas e um consequente aumento da concentração de hidroperóxidos. Este mesmo efeito pode ser facilmente verificado nos outros conjuntos de análise (d, e, f) ao se contrastar os resultados obtidos para as metalotioneínas e para a concentração de hidroperóxidos, mostrando uma relação inversa entre os resultados observados. Para os grupos expostos apenas às nanopartículas, estes não foram capazes de ativar as metalotioneínas e, portanto, ocorreu uma indução significativa de peroxidação lipídica nestes grupos, quando comparados ao metal em associação com as nanopartículas de TiO₂, com exceção do conjunto de análises (f), e ao metal alumínio.

Os estudos *in vitro* também mostram evidências de estresse oxidativo de nanopartículas em linhagens celulares de peixe. Reeves *et al.* (2008) em um estudo utilizando células de peixe da linhagem GFSk-S1, demonstraram que nanopartículas de TiO₂, na ausência de foto-ativação, ocorreu uma indução da genotoxicidade, provavelmente como resultado da produção de radicais livres. Vevers e Jha (2008) expuseram células da linhagem gonadal de truta arco-íris (RTG-2) às nanopartículas de TiO₂ com e sem radiação ultravioleta (UVA) e descobriram que, não houve elevação em danos de DNA na ausência de irradiação UVA, porém houve uma redução significativa na integridade lisossomal em 24h de exposição, sugerindo que o nanometal também foi capaz de danificar as células sem ativação ultravioleta.

Estudos recentes sugerem que o cérebro pode ser um importante órgão alvo nos estudos de nanomateriais com peixes. Desta forma, o ensaio cometa em tecido cerebral foi um dos escolhidos para realização neste trabalho. Novamente os resultados não mostraram efeito do metal alumínio em relação ao controle negativo, porém tanto os grupos expostos às nanopartículas de forma isolada, quanto os grupos expostos à co-exposição do metal com as nanopartículas, mostraram aumento dos danos ao DNA em relação ao controle negativo. Da mesma forma que os conjuntos de análise que avaliam os possíveis efeitos de interação destes contaminantes (d, e, f) os grupos expostos as nanopartículas mostraram um maior dano ao DNA em relação aos outros grupos, novamente evidenciando um efeito do metal quando exposto concomitantemente com as nanopartículas de TiO₂. Em um estudo prévio, uma elevada peroxidação lipídica foi relatada no cérebro, porém não em brânquias ou fígado, de exemplares juvenis de *Micropterus salmoides* expostos ao C₆₀ (OBERDOSTER, 2004).

Mudanças sutis foram verificadas em cérebros de peixes em muitos outros estudos, assim como para mamíferos, fazendo com que houvesse um aumento da preocupação acerca da neurotoxicidade destas nanopartículas. É importante ressaltar que esses dados para os cérebros de peixes, não são baseados em uma detecção quantitativa de nanomateriais no cérebro. Muitos dos efeitos relatados podem ser apenas efeitos de toxicidade secundária, como por exemplo, a hipóxia derivada de danos nas brânquias. A exposição à nanopartículas metálicas também pode causar distúrbios bioquímicos no cérebro de *O. mykiss*, e esses efeitos podem ocorrer tanto por via aquática, quanto por exposições via dieta. Federici *et al.* (2007) observaram uma elevação no ensaio TBARS, o teor de água e flutuações em níveis de Cu, Zn, Mn e K⁺ no cérebro de *O. mykiss* expostos a 1 mg/L às nanopartículas de TiO₂, via hídrica. Em seu estudo de exposição via dieta com TiO₂, Ramsden *et al.* (2009) relataram flutuações nos níveis no cérebro de Cu e Zn, bem como uma diminuição de 50% na totalidade do cérebro de Na⁺ K⁺-ATPase em *O. mykiss* alimentados com nanopartículas de TiO₂ (10 e 100 mg/kg) durante 10 semanas. A elevação da concentração de titânio total nos cérebros destes peixes também foi relatada para confirmar a exposição, embora não estivesse claro se este titânio estava na sua nanoforma ou como íons metálicos.

Confirmar a presença de nanomateriais no tecido cerebral pode ser crucial para dados interação, e tal como referido anteriormente, os métodos para medir nanomateriais em tecidos têm de ser desenvolvidos. Embora os estudos acima referidos relatem efeitos biológicos no cérebro de peixes, há poucas evidências que os nanomateriais também estão presentes no tecido cerebral; e parece provável que a toxicidade secundária (por exemplo, devido à produção de EROs e hipóxia) também ocorrerá.

Embora os dados tenham sido coletados no cérebro dos peixes, as evidências até o momento são favoráveis à captação de um número pequeno ou insignificante de nanomateriais no tecido cerebral. Isto deve ser visto em contexto, uma vez que este é o caso de muitos outros poluentes. No estudo de embriões de peixe por Kashiwada (2006), a fluorescência a partir de nanopartículas de látex foi detectada no cérebro de *O. latipes*, mas apenas em níveis basais. Utilizando um ensaio de hidroperóxidos modificados, Shinohara *et al.* (2009) concluiu que o particionamento dos fulerenos C₆₀ para o cérebro de *C. carpio* foi insignificante. Em outros estudos, não ocorreu um acúmulo significativo de titânio após a exposição hídrica a 1 mg/L de nanopartículas de TiO₂ em *O. mykiss* ao longo de 14 dias (FEDERICI *et al.*, 2007) ou em *O. mykiss* injetados intravenosamente com 100 µg de nanopartículas de TiO₂ (SCOWN *et al.*, 2009)

A avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), que em peixes é encontrada no cérebro, eritrócitos e no músculo (KLEMZ e SILVA DE ASSIS, 2005), é um biomarcador bioquímico de neurotoxicidade, pois esta é uma enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na sinapse, facilitando a transmissão de impulsos nervosos de um neurônio para outro, prevenindo que ocorra um estímulo contínuo do neurônio, mantendo o funcionamento normal do sistema motor e sensorial. Para este estudo, realizamos a análise da enzima AChE em dois tecidos diferentes: no cérebro e no músculo dos peixes. A atividade da AChE cerebral mostrou uma diminuição da atividade no grupo expostos ao alumínio, nos grupos expostos às três concentrações de nanopartículas deste experimento e à dois grupos de associação de contaminantes (Al+0,1 NP; Al+1 NP) enquanto que o terceiro grupo de associação (Al+10 NP) não mostrou diferenças na atividade desta enzima, quando comparada ao controle negativo. Em relação aos metais, o que geralmente se observa é esta inibição na atividade desta enzima, que normalmente está relacionada a concentrações elevadas dos contaminantes (PRETTO *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2009) e que pode ter sofrido uma inibição ainda maior devido à presença das nanopartículas neste tecido, como infere-se através dos resultados observados pelo ensaio cometa do cérebro. Os outros conjuntos de análise evidenciaram que não ocorreu nenhum tipo de interação entre os contaminantes para este biomarcador, visto que para os três conjuntos de análise (d, e, f) as três concentrações de nanopartículas mostraram que ocorreu uma diminuição na atividade da enzima, quando comparados ao metal alumínio e apenas um grupo de associação de contaminantes (Al+1 NP) também mostrou uma redução da atividade desta enzima. Para a AChE muscular, o grupo exposto ao metal alumínio apresentou um aumento da atividade da enzima AChE, em relação ao grupo controle negativo, possivelmente pois os metais não são inibidores específicos desta enzima (STURM, SILVA DE ASSIS e HANSEN, 1999). Além disso, dois grupos expostos às nanopartículas de TiO₂ apresentaram um aumento da atividade da AChE muscular: 1 NP e 10 NP, em relação ao controle negativo. O grupo exposto à menor quantidade de nanopartículas mostrou uma inibição da atividade da enzima AChE, quando comparado ao grupo exposto ao alumínio e à associação de contaminantes (conjunto de análise d). Os outros grupos não mostraram mudanças na atividade desta enzima.

Finalmente, o presente trabalho mostrou os efeitos sobre diferentes biomarcadores após exposição trófica às nanopartículas de TiO₂ e o metal alumínio, tanto isolados quanto expostos de forma conjunta. Mais estudos serão necessários, a fim de se elucidar as causas das alterações observadas e para determinar se existem efeitos diretos das nanopartículas de TiO₂ nos tecidos, principalmente no tecido cerebral. Os resultados encontrados neste trabalho

ajudam a esclarecer os efeitos tóxicos das nanopartículas de TiO_2 em peixes e elucidar os efeitos de uma co-exposição entre as nanopartículas e os metais.

CONCLUSÃO

A espécie *Hoplias intermedius* é um organismo relativamente fácil de manter em condições laboratoriais e, por ser uma espécie endêmica, utilizada como fonte de proteína para populações ribeirinhas, possui fundamental importância para o desenvolvimento de estudos de monitoramento ambiental.

O presente estudo demonstrou que nanopartículas de TiO_2 aplicadas em baixas doses, utilizando uma exposição crônica via trófica, apresentaram capacidade de alterar atividades enzimáticas, causando danos ao DNA e induzindo apoptose em eritrócitos e no tecido hepático de *Hoplias intermedius*. Além disso, na associação entre nanopartículas de TiO_2 e o sulfato de alumínio, foi possível observar alterações importantes nas respostas dos biomarcadores, possivelmente relacionadas ao efeito de uma possível interação existente entre as nanopartículas e os íons metálicos, que consequentemente apresentou diferentes respostas quando comparada com os grupos tratados somente com o alumínio ou com as nanopartículas de TiO_2 .

A maioria de literatura referente aos efeitos do alumínio em peixes está relacionada a estudos de morfologia e fisiologia, com poucos trabalhos informando sobre os possíveis efeitos genotóxicos deste metal. Além disso, este trabalho teve como importância o estudo de nanopartículas de TiO_2 em baixas doses, pois dados de estudos *in vivo* destas nanopartículas em peixes ainda são escassos e os dados muito controversos, devido à complexidade das propriedades físico-químicas de nanopartículas e a dificuldade em se comparar resultados, à fim de encontrar um padrão de resposta à estas nanopartículas.

CAPÍTULO III

Internalização celular e comportamento de diferentes nanopartículas de prata e do íon Ag^+ , utilizando cultivo celular 3D de hepatócitos de truta arco íris (*Onchorynchus mykiss*).

Autores: Taynah Vicari, Matthew Baron, Richard Maunder, Alessandro LaTorre, Graham Rance, Marta Margarete Cestari, Awadesh Jha.

Manuscrito em preparação

RESUMO

O potencial efeito negativo dos nanomateriais manufaturados na saúde do ecossistema aquático tornou-se uma preocupação crescente. Os nanomateriais de prata, em particular, têm sido extensivamente estudados para avaliação de risco, pois eles são utilizados em um grande número de produtos de consumo humano, ou são obtidos como subprodutos de processos industriais. Uma variedade de nanopartículas de prata, produzidas com diferentes revestimentos superficiais, foram descritos na literatura e uma gama de mecanismos de toxicidade diferentes foi relatada. Enquanto avaliávamos *in vitro* os riscos potenciais associados com diferentes nanopartículas de prata, verificou-se que diferentes propriedades da superfície dos nanomateriais, em diferentes composições de meio são pouco estudadas, porém podem influenciar na acumulação e podem acarretar em propriedades tóxicas dessas nanopartículas. Neste trabalho, apresentamos os resultados de estudos que mediram a entrada nas células e a distribuição de dois tipos diferentes de nanopartículas de prata que possuem superfícies químicas diferentes (dodecanetiol e PVP) e propriedades de solubilidade diferentes em esferóides 3D de fígado de peixe. Este modelo de esferoide *in vitro* demonstrou uma funcionalidade específica do órgão melhor do que o modelo *in vitro* convencional em 2-D. Antes da avaliação da sua potencial toxicidade, foi realizada a caracterização das nanopartículas de prata, em meio de cultura (L-15) com e sem soro (SBF a 10%). Estas técnicas de caracterização incluíram microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia UV-VIS, dinâmica e análise de fase por espalhamento de luz (DLS e PALS, respectivamente). Foi determinado ainda o acúmulo relativo dessas duas nanopartículas de prata, neste modelo *in vitro*, utilizando espectrômetro de massa indutivamente acoplado (ICP-MS) e estudos de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Posteriormente aos estudos de bioacumulação, foi avaliada a atividade de biotransformação (EROD) e estresse oxidativo em termos de glutathione total e peroxidação lipídica (TBARS). Os estudos de caracterização sugeriram uma mudança na química de superfície e solubilidade destas nanopartículas, na presença de soro, que foi comum para ambas as nanopartículas utilizadas. Isto foi confirmado por espectroscopia UV-VIS, que mostrou a característica da superfície por ressonância de plasma de superfície (SPR), com o pico de absorbância em ~ 410 nm, em ambos os meios. De modo geral, nossos estudos indicam o modelo de esferóides 3D como um modelo eficiente e robusto para estudar a bioacumulação e potenciais efeitos tóxicos das diferentes formas nanomateriais manufaturados.

Palavras chave: prata, nanomateriais, esferóides de hepatócitos 3D.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a validação de métodos e testes reprodutíveis *in vitro*, que ofereçam uma alternativa aos testes convencionais *in vivo*, realizados em animais estão rapidamente se tornando uma ferramenta importante, principalmente em estudos toxicológicos para reduzir o uso de animais, assim como os princípios 3R's exigem (do inglês *Replacement, Refinement and Reduction*), bem como para elucidar os mecanismos e modo de ação dos contaminantes (MAZZOLENI *et al.* 2009; SCHOLZ *et al.* 2013). Em comum com os estudos toxicológicos realizados em mamíferos, ensaios *in vitro* que utilizam células de peixes vem sendo muito utilizados na ecotoxicologia, para o teste de contaminantes, (SÁNCHEZ-FORTÚN *et al.*, 2005) efluentes (DAYEH *et al.* 2002) e fármacos (BARTRAM *et al.* 2012; UCHEA *et al.*, 2013), bem como em estudos de avaliação e identificação de toxicidade (CASTANO e GOMEZ-LECHON, 2005).

O uso de células primárias e linhagens celulares de peixes vêm crescendo em importância nos últimos anos, juntamente com o número de pesquisas sugerindo a sua disponibilidade em substituir ou suplementar os testes *in vivo* (BABICH e BORENFREUND, 1987; CASTANO *et al.*, 1994). Testes de toxicidade que utilizam peixes podem ser caros, podem durar muito tempo, incluem uma questão ética controversa e nem sempre são utilizados com acurácia para predizer a toxicidade em seres humanos. O uso de métodos alternativos, entretanto, obteve um crescimento limitado até alguns anos atrás, provavelmente devido à falta de métodos viáveis, mas também à falta de consenso na sua aplicabilidade, de métodos de validação internacionais e de uma ampla aceitação por parte das agências regulatórias, como por exemplo, a OECD (SCHOLZ *et al.*, 2013).

Métodos convencionais de culturas *in vitro*, como o cultivo bi-dimensional de tecidos primários e o uso de linhagens celulares imortalizadas, tem sido extensivamente utilizados em um número amplo de estudos na área de toxicologia, particularmente para identificar endpoints *in vitro* que correspondam a efeitos de uma toxicidade específica e mecanismos de ação de contaminantes em órgãos alvo ou em diferentes tipos celulares (RAISUDDIN e JHA, 2002; ZUCCO *et al.*, 2004; XIAO *et al.*, 2007; BORNSCHEIN *et al.*, 2008; REEVES *et al.*, 2008; VEVERS e JHA 2008; PAPIS *et al.*, 2011). Apesar de suas vantagens econômicas e éticas, em relação aos estudos realizados *in vivo* e em larga escala, particularmente estes modelos convencionais *in vitro* podem deixar passar muitas características importantes do tecido intacto e conseqüentemente, do ambiente *in vivo*. Infelizmente, muitas das linhagens celulares utilizadas em estudos toxicológicos, são incapazes de desenvolver *in vitro todos os*

estágios de desenvolvimento, diferenciação e envelhecimento, que são características de um tecido *in vivo*.

As células primárias de peixes podem transpor algumas dessas dificuldades e podem expressar muitas das estruturas de diferenciação celular, assim como as funções de seu tecido de origem (DOWLING e MOTHERSILL 2001; SEGNER e CRAVEDI, 2001). Entretanto, culturas de curto tempo e perda de funcionalidade de órgãos limitam o seu uso em longo prazo, dificultando estudos crônicos e de bioacumulação. As linhagens celulares, embora sejam consideradas menos diferenciadas que as células primárias, fornecem dados mais facilmente e constituem um sistema modelo – padrão. Entretanto, a natureza das condições de cultivo (uma monocamada crescendo em uma estrutura 2-D, de plástico ou vidro) não representa, de modo geral, as condições de crescimento ou de arquitetura tridimensional (3-D) encontrada nos tecidos *in vivo*, e tampouco detecta de modo preciso, a toxicidade órgão específica.

As células que crescem em um sistema 3D se desenvolvem em estruturas parecidas com tecidos, mais similares às aquelas formadas em organismos vivos. Para as células, o seu formato e o seu ambiente são importantes na determinação do crescimento, de seu comportamento e de sua expressão gênica (KIM, 2005), que pode ser bem diferente daquele modo convencional dos modelos em monocamadas (2D) (BISSELL *et al.*, 1982; CHANG e HUGHES-FULFORD, 2008). Funções bioquímicas específicas de cada órgão como a glicose, albumina, ureia e liberação de enzimas (MA *et al.* 2003; XU *et al.* 2003a; XU *et al.* 2003b) e importantes sistemas enzimáticos de biotransformação, como o CYP 450 (FLOURIOT *et al.*, 1995; CRAVEDI *et al.*, 1996) são mantidos ao longo do tempo em cultura celular, evidenciando a sua estabilidade e a sua performance bioquímica. Além disso, culturas celulares em 3-D podem ser compostas por células com diferentes fenótipos como, por exemplo, células em divisão, células que não se dividem e células necróticas (KIM, 2005). Também, ao compararmos com o cultivo celular 2-D em monocamadas, no qual o crescimento é tipicamente irrestrito e ilimitado, se espaço e nutrientes forem fornecidos para as células, o crescimento para o cultivo de células em três dimensões tende a ser autorregulado (FOLKMAN e HOCHBERG, 1973), pois as células crescem em torno parâmetros críticos, como o diâmetro e o número de células, que são características importantes para a regulação do crescimento do tecido.

As células do fígado são muito úteis e convenientes na investigação do metabolismo de xenobióticos em peixes, principalmente por que o fígado possui um papel muito importante na desintoxicação de xenobióticos. As frações sub celulares derivadas dos

homogenatos do fígado (S9) são comumente utilizadas para a avaliação do potencial metabólico dos compostos em peixes (GOMEZ *et al.*, 2010; JOHANNING *et al.*, 2012). Embora os ensaios que utilizem a fração S9 sejam rápidos e relativamente de baixo custo, a taxa metabólica pode ser muito influenciada pela adição de diferentes cofatores (UCHEA *et al.*, 2013), além disso, é necessário que tenha ocorrido o *uptake* do composto químico no órgão de estudo. O uso das frações S9 ainda é pouco sensível quanto à complexidade celular e a composição de organelas de sistemas celulares intactos, que potencialmente podem afetar a predição de taxas metabólicas (HAN *et al.*, 2009). Os ensaios que utilizam hepatócitos são muito utilizados por serem conhecidamente capazes de detectar efeitos tóxicos em contaminantes tanto de forma isolada, quanto em amostras ambientais (TOLLEFSEN *et al.*, 2006). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso do cultivo celular 3-D de hepatócitos, desenvolvido para a truta arco íris, na avaliação da internalização celular e do comportamento de diferentes tipos de nanopartículas de prata, bem como do íon prata (Ag^+).

As nanopartículas são definidas como possuindo duas ou três dimensões entre 1-100 nm e, por este motivo, possuem características físico-químicas próprias, quando comparadas aos mesmos materiais particulados. Essas propriedades incluem uma elevada reatividade devido a uma grande área de superfície. As nanopartículas de prata (AgNPs), juntamente com as nanopartículas de dióxido de titânio, são as nanopartículas mais utilizadas em produtos de consumo humano. Produtos de consumo humano que contém nanopartículas de prata constituem as lavadoras de roupa, produtos médicos e dentários, roupas, produtos de uso pessoal antibacteriano e antifúngico, que entram nos corpos d'água, através do esgoto doméstico e industrial. Alguns estudos sugerem que as nanopartículas de prata não possuem apenas propriedades antibacterianas, mas também possuem propriedades citotóxicas e podem induzir à produção de espécies reativas de oxigênio, através da indução de estresse oxidativo. A prata, em sua forma iônica (Ag^+), é bem conhecida por ser tóxica aos organismos aquáticos em concentrações de $\mu\text{g/L}$ (DAVIES *et al.*, 1978) e um modo de ação conhecidamente tóxico é pela inibição da Na^+/K^+ ATPase e o consequente distúrbio no balanço iônico (WOOD *et al.*, 1996). Além disso, este mecanismo se mostrou similar para diferentes organismos aquáticos como peixes, *Daphnia* e *crayfish* (BIANCHINI e WOOD, 2002; GROSELL *et al.*, 2002).

Assim como outros materiais produzidos pelo homem, tanto estudos *in vitro* como *in vivo* a respeito dos efeitos biológicos das nanopartículas devem ser testados. Sistemas *in vitro* são responsáveis por promover uma resposta rápida e efetiva em relação à avaliação de nanopartículas a partir de diversos *endpoints* toxicológicos. Eles também permitem o desenvolvimento mecanismos de avaliação dirigidos e promovem uma informação refinada

de como as nanopartículas interagem com as células (ARORA *et al.*, 2009). Algumas vantagens em se utilizar sistemas *in vitro* em diferentes linhagens celulares incluem; (1) revelação dos efeitos primários de células alvo, na ausência de efeitos secundários causados por inflamação; (2) identificação de mecanismos primários de toxicidade na ausência de fatores fisiológicos e fatores compensatórios que podem confundir as interpretações de estudos em animais; (3) eficiência, rapidez e custo efetivo baixo e (4) possibilidade de melhorias no design de estudos, substituindo estudos com animais, que muitas vezes possuem um alto custo (HUANG *et al.*, 2010).

Os riscos potenciais de apenas utilizar ensaios *in vitro* para os testes nanotoxicológicos foram bem documentados no trabalho de Donaldson *et al.* (2009) e os autores verificaram que as células em cultura não são expostas à alguns efeitos patogênicos que são observados *in vivo* e que estão, pelo menos em parte, relacionado a questões como translocação, toxicocinética e respostas coordenadas em tecidos, uma das áreas que ainda estão menos avançadas dentro da toxicologia. Em um artigo recente Dhawan e Sharma (2010) revisaram os métodos, tanto para estudos *in vitro*, como para estudos *in vivo*, aplicados na avaliação da toxicidade de nanomateriais. Neste trabalho os autores discutem as interferências dos nanomateriais nos ensaios *in vitro* (devido às características físicas e químicas próprias destes materiais), bem como os maiores desafios para os ensaios *in vitro* como a dosimetria, otimização da dispersão, avaliação de interações e biodistribuição. Por este motivo, é essencial a utilização de múltiplos ensaios, que devem ser utilizados levando-se em consideração o tipo de nanomaterial, em adição a técnicas de análise por imagens, como a microscopia eletrônica de transmissão, para a validação de ensaios de viabilidade que utilizem marcadores químicos (ARORA *et al.*, 2009).

Como mencionado anteriormente, a saúde dos organismos vivos pode ser comprometida pela exposição às substâncias genotóxicas. As nanopartículas estão sendo cada vez mais aplicadas em diferentes atividades industriais e sua detecção em ambientes aquáticos já tem sido relatada, sendo então enquadradas na categoria de poluentes emergentes. Apesar de ser crescente o número de estudos sobre os impactos das nanopartículas aos organismos vivos, os resultados contraditórios da ação destes agentes químicos até o momento, faz com que seja necessária a realização de estudos adicionais para uma estimativa precisa dos perigos conferidos por este contaminante aos organismos expostos.

Os peixes são excelentes organismos-teste para estudos de Toxicologia Aquática e o emprego de espécies exóticas e/ou nativas deve ser considerado dependendo do objetivo do estudo. Contudo, devido a razões éticas e legais, alguns esforços têm sido realizados na

tentativa de se aplicar técnicas de cultivo celular para reduzir o número de animais, incluindo peixes, em estudos toxicológicos, aumentando, assim, os ganhos com relação à elucidação dos mecanismos de ação de contaminantes ambientais, com o objetivo de proteger o meio ambiente e a saúde humana (VEVERS e JHA, 2008).

O cultivo celular 2D (monocamadas) tem sido muito utilizado para elucidar efeitos tóxicos de agentes químicos. No entanto, sabe-se que células cultivadas em monocamadas podem não ser representativas de órgão e tecido *in vivo*, resultando em uma falha na predição da resposta a agentes tóxicos. Com o intuito de superar estas limitações do cultivo celular tradicional (2D), pesquisadores tem desenvolvido novos tipos de cultivo celular 3D, como os esferoides celulares. Até o momento, estudos empregando esferoides 3D foram desenvolvidos e validados apenas para avaliações de toxicidade em mamíferos e a possibilidade de sua aplicação em estudos ambientais foi cogitada apenas há alguns anos atrás, utilizando espécies aquáticas (peixes) como modelo (BARON *et al.*, 2012).

O modelo de cultivo celular 3D que já foi desenvolvido para peixes refere-se à construção do esferoide celular de células do fígado de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Existem algumas vantagens do sistema de cultivo celular 3D em relação ao 2D, o qual emprega tanto linhagens celulares estabelecidas como células primárias de diferentes órgãos/tecidos de peixes. Dentre as vantagens, temos que as células cultivadas em formato esferoidal (3D) podem ser utilizadas para ensaios crônicos e de bioacumulação, uma vez que podem ser mantidas em cultivo por pelo menos um mês (BARON *et al.*, 2012), ao contrário das células cultivadas em sistema 2D, as quais tem vida curta em cultivo (~ 1 semana).

Apesar do cultivo celular 3D, como os esferoides celulares, ser uma valiosa alternativa *in vitro* para o futuro dos estudos ecotoxicológicos com peixes, por se enquadrar no princípio dos 3R's na Toxicologia e por mais se assemelhar às condições fisiológicas do órgão/tecido *in vivo*, ainda há muito a se compreender sobre as vantagens e limitações deste modelo (BARON *et al.*, 2012). Portanto, estudos de verificação da sensibilidade dos diferentes sistemas de cultivo celular (2D e 3D) em peixes, na detecção de agentes tóxicos é extremamente relevante e necessária principalmente no âmbito da Toxicologia Aquática, a qual encontra-se em um estágio de desenvolvimento inferior às metodologias alternativas *in vitro* já propostas e validadas para mamíferos.

Neste contexto, as pesquisas atuais empregando células de peixe *in vitro* têm como objetivo inicial o desenvolvimento e validação da utilidade das células cultivadas em monocamadas e como esferoides celulares a partir de diferentes órgãos/tecidos peixes. Particularmente em respeito ao cultivo 3D (esferoides celulares), estes podem permitir que os

contaminantes possam ser estudados por uma simulação de cenários de exposição ambiental mais realísticos, como por exemplo, vias hídrica e trófica. Uma vez desenvolvido e caracterizado, estas alternativas *in vitro* de peixes podem ser avaliadas quanto as suas sensibilidades de detecção de contaminantes aquáticos, como as nanopartículas, comparando-se as respostas a estudos *in vivo* já realizados e descritos na literatura.

OBJETIVO

Este trabalho tem como principal objetivo avaliar a utilização do sistema de cultivo celular de hepatócitos (células primárias) em 3D, desenvolvido para truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*), no estudo da absorção, toxicidade e bioacumulação de nanopartículas de prata, cobertas com diferentes compostos.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação e caracterização das nanopartículas de prata (AgNPs)

Para a realização deste trabalho foram utilizadas duas nanopartículas de prata diferentes. Uma delas foi adquirida comercialmente (marca: Sigma Aldrich®) e possui certa quantidade de PVP em sua composição. A outra nanopartícula de prata foi produzida pela Universidade de Nottingham, e possui a sua superfície recoberta por dodecanetiol. Para a caracterização destas nanopartículas, foi confeccionada uma suspensão de 1 mg/ml para cada nanopartícula, que foi homogeneizada por uma breve sonicação de 30 segundos, a temperatura ambiente (Langford Sonomatic 375, 40 kHz). Foram então utilizados dois meios de cultura para a caracterização destas nanopartículas, a saber: o meio de cultura L-15 sem adição de soro bovino fetal (SBF) e o meio L-15 com adição de soro bovino fetal (SBF). Os métodos utilizados para a análise destas suspensões foram: UV-VIS registrado em suspensão (marca: Perkin Elmer Lambda 25), utilizando cubetas de quartzo de 1 cm, com uma taxa de varredura de 480 nm/ min, ao longo do intervalo de 250-900 nm. As análises de DLS e PALS foram realizadas utilizando o instrumento Nano-ZS zetasizer (marca: Malvern), em temperatura ambiente. Os valores apresentados são o resultado médio de três medidas realizadas pelo aparelho. As amostras de microscopia eletrônica de transmissão foram preparadas através da utilização de telas de cobre, recobertas com filme de carbono, que foram submersas nas nanopartículas em suspensão e montadas até a completa secagem da mesma.

A verificação do diâmetro das nanopartículas foi realizada usando software Gatan Digital Micrograph[®], fornecido gratuitamente no site da empresa JEOL Ltda.

Para as exposições aos esferoides, ambas as nanopartículas foram preparadas em meio L-15 (sem vermelho de fenol), em uma suspensão de estoque na concentração de 200 mg/L. Para tanto, as suspensões de estoque das nanopartículas de prata foram sonicadas, quando em suspensão, por 30 min em um banho maria sonicador (marca: Fisherbrand[®]). Após este período, as suspensões foram diluídas em meio de cultura L-15 (sem vermelho de fenol) até a concentração de 2 mg/L e foram então sonicadas por mais 15 min em um banho maria sonicador (marca: Fisherbrand[®]). Além da exposição aos diferentes tipos de nanopartículas de prata, os esferoides também foram expostos ao nitrato de prata (AgNO₃), na mesma concentração das nanopartículas. A concentração final em cada poço da placa de 6 poços utilizadas nestes experimentos foi de 1 mg/L e foi determinada através da literatura (FARKAS *et al.*, 2010; FARKAS *et al.*, 2011; YUE *et al.*, 2014)

Obtenção dos hepatócitos

Para a obtenção de culturas de hepatócitos primários em truta arco íris, apenas fêmeas, com peso entre 100-200g, foram utilizadas. Antes do sacrifício, os peixes não foram alimentados por 24 h. Os animais foram sacrificados através de uma concussão cerebral, seguida de uma destruição do cérebro. Os peixes foram, então, medidos e pesados, a sua superfície corporal esterilizada com etanol 70% e transferidos para uma bancada de dissecação.

Para a obtenção das células, o fígado foi dissociado por perfusão com a enzima collagenase, segundo Nabb *et al.* (2006) e Baron *et al.* (2012), como segue. Uma cânula foi inserida na veia porta hepática e o fígado sofreu uma limpeza com 10 mL de HBSS sem cálcio e magnésio e com a adição de 2,3 mM EDTA e 4,2 mM de NaHCO₃ (pH 7,4). O fígado passou por uma dissociação enzimática com 20 mL de HBSS, com adição de cálcio e magnésio, 0.1% da enzima Collagenase D e 4,2 mM de NaHCO₃. Finalmente, o fígado passou por uma etapa de limpeza com 5 mL de meio de cultura L-15 (pH 7,4). Todos os estágios da perfusão utilizaram uma taxa peristáltica de 1 mL/min. Após estas etapas, o fígado foi removido e colocado em uma placa de Petri estéril e dissociado mecanicamente, em meio L-15 e passado através de um filtro de 100 µm. Em seguida, a suspensão celular foi passada através de um filtro de 70 µm. As células foram então coletadas através de centrifugação (50 xg, 5 min e 16°C), o sobrenadante foi removido e o pellet foi ressuspensionado em 20 mL de meio L-15, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). A viabilidade celular foi determinada pelo uso do teste de exclusão de Trypan blue (0,2%-v/v) e suspensões celulares

com viabilidade celular $\geq 85\%$ foram utilizadas para os experimentos. As células foram imediatamente transferidas para microplacas, após o isolamento, para maximizar a viabilidade celular e sua manutenção.

Construção dos esferóides com hepatócitos primários

As suspensões celulares diluídas (1×10^6 células/ mL) em meio L-15, suplementado com 10% de soro bovino fetal (pH 7,4) foram transferidas para placas de 6-poços, sem tratamento para adesão celular, e pré cobertas com 500 μ L de solução de p-HEMA a 2,5%, a fim de não permitir a adesão dos hepatócitos à superfície da placa de cultivo celular. As placas foram mantidas a 18°C em uma incubadora BOD sob uma plataforma com agitação orbital e uma velocidade constante de 70 rpm. Após 24 h, quando os agregados começaram a se formar, 1,4 mL do meio de cultura foi removido e novo meio de cultura (1,5mL) suplementado, foi adicionado. Este procedimento foi realizado a cada 48 h, até o oitavo dia de cultivo, quando a construção dos esferóides está completa (BARON *et al.*, 2012).

Exposição dos esferóides às AgNPs

Após oito dias de cultivo dos esferóides, quando estes já estão formados é que tem início a exposição às diferentes nanopartículas de prata. As suspensões de nanopartículas de prata na concentração de 2 mg/L são sonicadas durante 15 minutos, antes de serem utilizadas na exposição dos esferóides. Os esferóides, por sua vez, são centrifugados para a remoção do meio de cultivo (L-15 +10% SBF) e adição de um novo meio, porém sem suplementação (apenas L-15, sem vermelho de fenol). Depois de passarem por este processo por 3 vezes, os esferóides são contados e plaqueados a uma densidade de 1000 esferóides por poço, utilizando novamente as placas de 6 poços para exposição às nanopartículas de prata. Dentro de cada poço, as quantidades de meio de cultura adicionado ao meio de exposição devem ter no total, 3 ml e a concentração final das suspensões de nanopartículas por poço deve ser de 1 mg/L. Além da exposição às nanopartículas de prata, os esferóides também foram expostos ao nitrato de prata (AgNO_3), na mesma concentração de 1 mg/L.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Decorrido o período de exposição, os esferóides, plaqueados em uma concentração de 1000 esferóides por poço, foram fixados em dois estágios: (1) 2.5% glutaraldeído por 1 h, lavados em água destilada e então, (2) 1% tetróxido de ósmio (0.1 M em tampão cacodilato; pH 7.2) por uma hora. Amostras foram então lavadas com PBS e desidratadas na sequência que se segue: etanol 30%, 50%, 70%, 90% e duas vezes em etanol 100% – 5 min para cada etapa). Amostras seguiram então para a seguinte sequência: óxido de propileno 2x: resina pura 1x e alterando a proporção de óxido de propileno e resina nas seguintes proporções (a) 1 : 1, (b) 1 : 2 e seguido por (c) 100% de resina por 1h. Amostras foram então transferidas para um molde de resina, com a resina recém-preparada e deixada por 24 h a 60°C até a polimerização completa da mesma. Após este tempo, os blocos de resina foram seccionados (80 nm) utilizando um ultra micrótomo, montadas em telas de cobre e coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo por 1 h. As amostras foram então observadas em microscópio eletrônico de transmissão (modelo: JEM-1200 EXII, marca: JEOL Ltda, UK).

Microscopia eletrônica de transmissão acoplada com a técnica *Energy dispersive X-ray spectroscopy* (EDX)

Este processo consiste mesmos passos descritos anteriormente para a técnica de microscopia eletrônica de transmissão, porém, com a utilização de telas diferentes para a colocação do material e de equipamentos com softwares específicos, é possível a detecção de materiais que não podem ser diferenciados devido à limitação da técnica de microscopia eletrônica. Existem dois tipos possíveis de análise com esta técnica: o *EDX spectra* e o *EDX mapping*. Com o *EDX spectra* é responsável por gerar picos luminosos diferentes para materiais de composição diferentes e com isso, consegue-se saber quais os materiais que estão presentes nesta amostra. Já o *EDX mapping* consegue, além de detectar quais os materiais presentes nesta amostra, consegue colori-los com cores diferentes, facilitando a análise de quais os elementos presentes nesta amostra. Neste trabalho as amostras serão analisadas utilizando o equipamento Oxford instruments® INCA 560 X-ray *micro analysis system*.

Determinação da concentração de prata (ICP- MS)

Depois de decorrido o tempo de exposição, mexendo a placa gentilmente, percebe-se que os esferóides tendem a se dirigir para o centro das placas de seis poços. Quando todos os esferóides estiverem no centro dos poços, eles podem ser removidos com o meio de cultura e transferidos para microtubos do tipo eppendorf® de 1,5 mL, retirando 1 mL de suspensão

celular (esferoides + meio de cultura de exposição). Depois, as amostras são rapidamente centrifugadas, durante 60 s para a separação dos esferoides do sobrenadante. O sobrenadante foi removido para um tubo Falcon® de 15 mL, ao qual foi adicionado 1 mL de ácido nítrico (puro). No microtubo aonde restaram os esferoides, foi adicionado 0.5 mL de ácido nítrico (puro). Ambas as amostras foram armazenadas em geladeira até serem processadas. Antes de serem analisadas, as amostras, além de serem digeridas pelo ácido nítrico, foram digeridas também pelo calor, pois foram colocadas em banho-maria, a 100 °C, durante uma hora. Depois de removidas deste processo, as amostras foram diluídas para obtermos a mesma concentração de meio de cultura nas amostras e posteriormente analisadas no espectrômetro de massa indutivamente acoplado (marca: Thermo Scientific; modelo: X SERIES 2 ICP-MS).

Etóxiresorufina – o- deetilase (EROD)

Para a realização deste ensaio, além da exposição às nanopartículas de prata, os esferoides também foram expostos ao nitrato de prata em diferentes concentrações (0.02, 0.2, 2, 20 mg/L) pois exposições dos esferoides a íons metálicos ainda não foram verificados e faltam informações válidas a respeito da utilização desta técnica, bem como deste ensaio. O ensaio EROD foi realizado como descrito anteriormente por Behrens *et al.* (1998), com modificações para culturas de esferóides. Os esferóides foram preparados a partir do mesmo peixe e foram plaqueados em placas pretas, de 96 poços, revestidas com pHEMA (Falcon, VWR, Reino Unido, em 50 µL de meio L-15, sem soro (pH 7,4). Um controle positivo (0,36 µM de β-naftoflavona (BNF); concentração final) e um controle de solvente (0,1% de DMSO; concentração final), ambos dissolvidos em meio isento de soro foram então adicionados aos poços em volumes de 50 µL e as placas foram incubadas a 15°C, durante 48 h. Após o período de exposição, 50 µL de tampão de reação (meio L-15 sem soro, 16 µM 7-etóxiresorufina (7-ER), 18 µM dicumarol; concentrações finais bem; pH 7,4), foram adicionados a cada poço e a produção de resorufina medida num leitor de placas de fluorescência (SpectraMax M5, Molecular Devices, EUA; excitação, 544 nm, emissão, 590 nm) imediatamente após a adição do tampão de reação e a cada minuto, subsequentemente, durante 60 min. As curvas padrão de resorufina (0 - 256 pmol/ poço) foram produzidos para cada ensaio (150 µL de volume por poço). As soluções estoque de 7-etóxiresorufina (7-ER) e resorufina foram preparados em DMSO e o dicumarol em NaOH 1 M.

Para calcular a atividade da EROD para cultura de células vivas, a reação de linearidade foi representada graficamente para cada amostra ao longo do tempo. Para cada reação, a produção de resorufina foi determinada calculando a quantidade de resorufina (pmol) presente no poço em dois períodos de tempo diferentes. Usando a curva padrão de resorufina, valores da fluorescência foram então convertidos em quantidades de resorufina (pmol). A diferença na quantidade resorufina foi dividida pelo número de minutos durante o qual a medição foi obtida (pmol/ min). Este valor foi depois dividido pelo valor de proteína (mg), obtido a partir do ensaio de proteína. Atividade EROD foi então expressa como: pmol min⁻¹. mg de proteína.

Ensaio bioquímicos

Coleta e preparação de amostras

Para a realização destes ensaios que se seguem, além da exposição às nanopartículas de prata, os esferoides também foram expostos ao nitrato de prata em diferentes concentrações (0.02, 0.2, 2, 20 mg/L) e também a um controle positivo, formado através da mistura de 2 mM de sulfato de cobre (CuSO₄) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O tempo de exposição neste caso foi de 24 horas. Decorrido este tempo, as amostras foram preparadas como a seguir: os esferoides foram coletados depois de 24 horas de exposição aos contaminantes e ao controle positivo, e transferidos para microtubos do tipo eppendorf. Os tubos foram então centrifugados por 3 min a 900 G e o meio de cultura foi separado em outros microtubos do tipo eppendorf em alíquotas de 500 µL. Os esferoides (*pellet*) foram lavados duas vezes com 500 µL de DPBS e então sonicados por 60s em 125 µL de tampão de homogeneização (2 mM NaH₂PO₄, 2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM EDTA and 145 mM NaCl, pH 7.4) (XU *et al.*, 2003) utilizando um banho maria ultrassônico (marca Fisherbrand®). Toda o prepare das amostras foi realizado em gelo e tanto o meio de cultura quanto o homogenato foram armazenados à -20°C antes de serem utilizados nos ensaios.

Glutathione Total

A glutathione total foi determinada de acordo com o protocolo descrito por Owens e Belcher (1965). Neste protocolo, 40 µL do homogenato, branco ou padrão, foram adicionados em uma placa de 96 poços, em triplicata, contendo 20 µL de DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)), 260 µL de tampão de reação (100 mmol/ L de K₂HPO₄, 5 mmol/ L de

EDTA, pH 7.5), e 20 μ L de glutathione redutase. A reação é iniciada quando ocorre a adição de 20 μ L de NADPH, com as alterações na absorbância medidas em 412 nm (leitor de microplacas: SpectraMax M5, Molecular Devices, EUA), registradas ao longo de 10 min, e com o total de GSH (μ mol/ g de tecido úmido) determinada utilizando a curva de calibração padrão (Smith *et al.*, 2007).

TBARS (nível de peroxidação lipídica)

A peroxidação lipídica foi estimada pela quantificação do ensaio TBARS, seguindo a metodologia de Camejo *et al.* (1998). 40 μ L de homogenato (em triplicata) foram adicionados aos poços de uma placa de micro titulação de 96 poços, que contém 10 μ L de 1 mmol/ L hidroxitolueno butilado (2,6-di-O-terc-butil-4-metilfenol), e o volume final completado até 190 μ L com um tampão fosfato 0.1 M (pH 7,5). Seguindo isto, uma redução de 50% (w/ v) de ácido tricloroacético (TCA) e 1,3% (w / v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) (dissolvido em 0,3% (w/ v) de NaOH), foram adicionados, e a placa foi incubada a 60 °C, durante 60 min e, em seguida, colocada em gelo. Segue-se uma centrifugação da placa por 2 min. Posteriormente, a absorbância foi mensurada (em triplicatas) a 530 nm no leitor de microplaca (SpectraMax M5, Molecular Devices, EUA) com a seguinte curva padrão (0,5-25 nmol/ mL-1 1,1,3,3-tetraethoxypropane). Todos os dados do ensaio foram calculados e expressos como mg de proteína pelo volume de homogenato inicial adicionado.

RESULTADOS

Caracterização das suspensões de AgNPs

Os sobrenadantes para ambas AgNPs suspensas em meio L-15 mostraram –se incolor; com traços característicos ao longo do intervalo visível, tal como determinado pela espectroscopia de UV-VIS. Porém, para estas suspensões, não pode ser caracterizado utilizando a técnica PALS (potencial zeta - ζ) devido à insuficiência de material em suspensão estável. O que significa dizer que o tamanho dos agregados foram de $\sim 20 \mu\text{m}$ e foram registrados para as duas amostras AgNPs. Os tamanhos dos agregados foram maiores do que o instrumento pode medir com precisão.

Os sobrenadantes para ambas AgNPs suspensas em meio L-15 com adição de 10% de soro bovino fetal (SBF) (FIGURA 46) mostraram uma coloração amarelo muito claro, indicando a presença discreta de AgNPs, presumivelmente devido a uma alteração da sua composição química de superfície, na presença de SBF. O mais interessante foi que o mesmo efeito foi observado em ambas AgNPs. Essa informação foi confirmada por espectroscopia de UV-VIS, que mostrou o pico característico SPR em $\sim 410 \text{ nm}$, em ambos os meios para ambas as nanopartículas. Para as AgNPs recém-solvatadas, estas são carregadas negativamente de acordo com medições pelo método PALS e constituem uma distribuição bimodal de aglomerados de dimensões semelhantes, para ambas as amostras AgNPs (FIGURA 47), provavelmente devido à liberação de íons por essas nanopartículas, quando neste meio de cultura.

FIGURA 33 - RESULTADOS OS PROCESSOS DE CARACTERIZAÇÃO (EM SEQUÊNCIA DLS, PALS E UV-VIS) PARA AS DUAS AgNPs, EM MEIO L-15+ 10% SBF. LEGENDA: AgNP@PVP TRATA-SE DA NANOPARTÍCULA DE PRATA ADQUIRIDA DA EMPRESA SIGMA ALDRICH®, ENQUANTO QUE AgNP@Salk, TRATA-SE DA NANOPARTÍCULA DE PRATA PRODUZIDA PELA UNIVERSIDADE DE NOTTINGHAM.

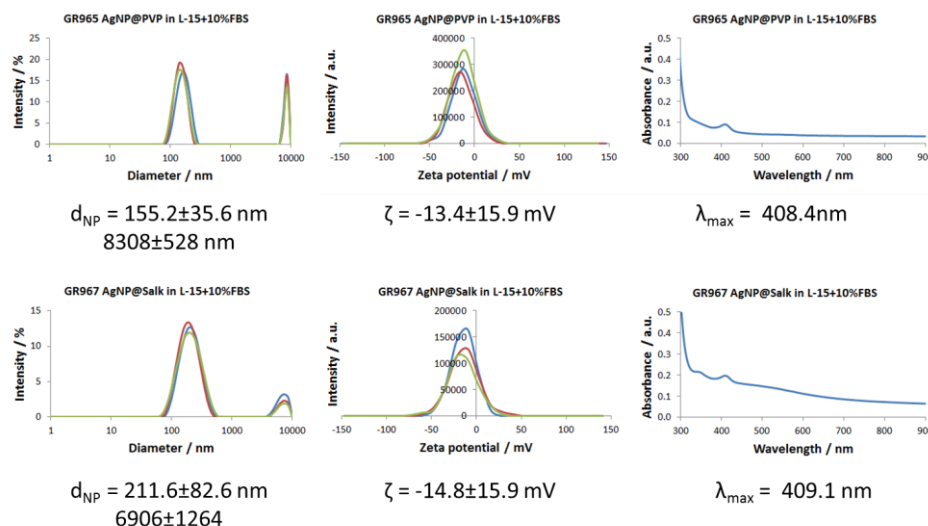
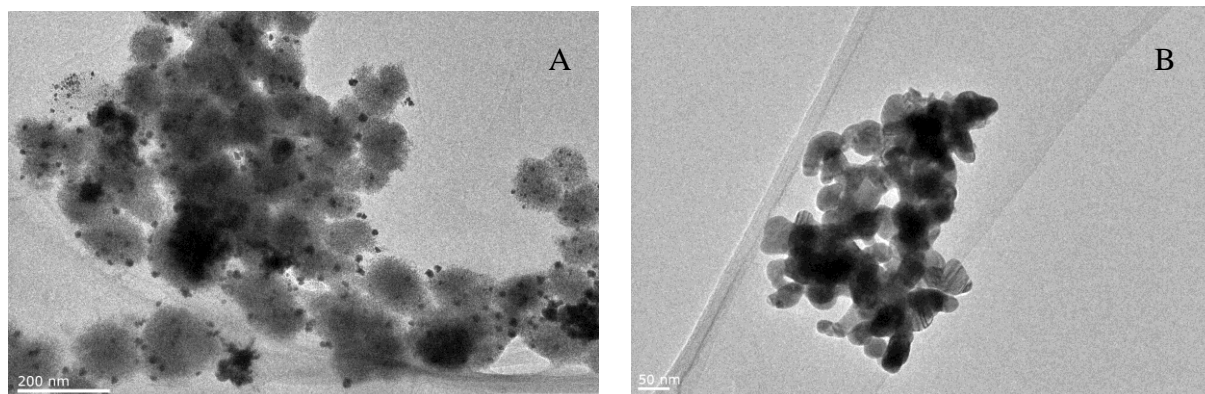


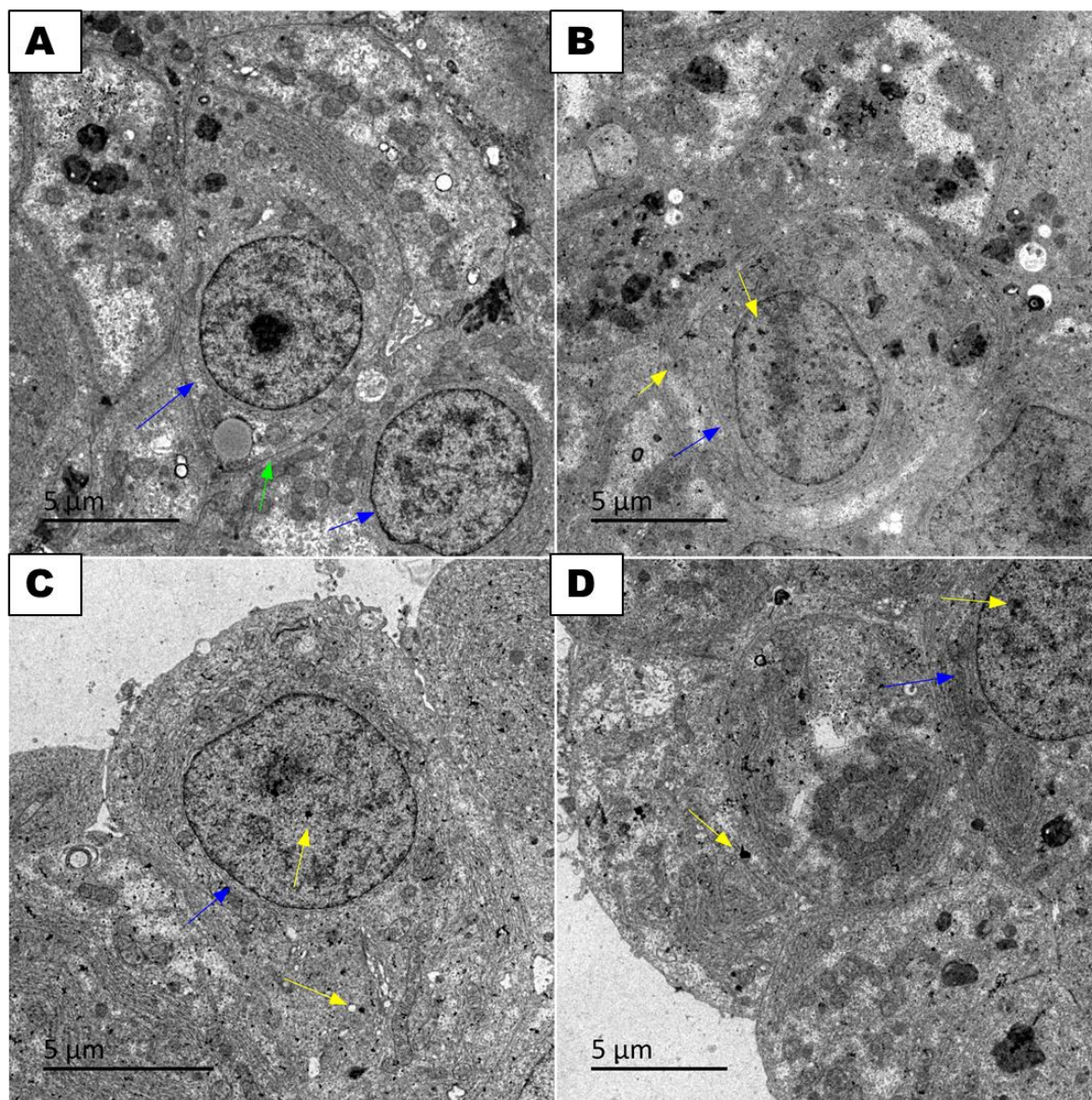
FIGURA 34 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PARA AS DUAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZADAS NESTE EXPERIMENTO. EM (A), A AgNP ADQUIRIDA DA EMPRESA SIGMA ALDRICH, QUANDO COLOCADA EM SUSPENSÃO EM MEIO L-15+10% SBF (ESCALA DE 200 nm). EM (B), A AgNP PRODUZIDA PELA UNIVERSIDADE DE NOTTINGHAM, QUANDO COLOCADA EM SUSPENSÃO EM MEIO L-15+10% SBF (ESCALA DE 50 nm).



Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os resultados obtidos através da microscopia eletrônica de transmissão para os esferoides, depois da exposição às nanopartículas de prata e ao nitrato de prata (AgNO_3) não mostraram diferenças estruturais entre os grupos controle e expostos aos contaminantes (FIGURA 48).

FIGURA 35 – IMAGENS DA SUPERFÍCIE DOS ESFERÓIDES DE HEPATÓCITOS DE TRUTA ARCO-ÍRIS UTILIZADOS NESTE EXPERIMENTO PARA CADA UM DOS GRUPOS EXPOSTOS, ADQUIRIDAS POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET). EM (A) IMAGEM DE UM ESFERÓIDE PERTENCENTE AO GRUPO CONTROLE NEGATIVO. EM (B) IMAGEM DE ESFERÓIDE PERTENCENTE AO GRUPO EXPOSTO AO NITRATO DE PRATA (AgNO_3). EM (C) IMAGEM DE UM ESFERÓIDE PERTENCENTE AO GRUPO EXPOSTO ÀS AGNPS ADQUIRIDAS DA EMPRESA SIGMA ALDRICH® E EM (D) IMAGEM DE UM ESFERÓIDE PERTENCENTE AO GRUPO EXPOSTO ÀS AgNPs PRODUZIDAS NA UNIVERSIDADE DE NOTTINGHAM.



Legenda: Setas azuis determinam a membrana nuclear dos hepatócitos; setas amarelas apontam a presença dos contaminantes dentro dos esferóides, nos mais diversos compartimentos celulares; setas verde: indica o ducto biliar, formado pelo esferoide.

DISCUSSÃO

Devido às suas propriedades físico químicas e propriedades antibacteriana, as nanopartículas de prata (AgNPs) são atualmente um dos nanomateriais mais utilizados no mundo (Woodrow Wilson International Center for scholars, 2011). Desta forma, com o intuito de avaliar a aplicabilidade do sistema de cultivo celular tridimensional após a exposição às nanopartículas de prata (AgNPs), obtivemos resultados satisfatórios em relação ao modelo, construído primariamente para a avaliação de fármacos.

Muitos são os fatores que esperamos, interfiram na toxicidade dessas partículas, a saber: o estado de aglomeração, o comportamento da partícula quando em meio de cultura, a biodisponibilidade, assim como a concentração de prata dissolvida e disponível para internalização, principalmente devido aos possíveis efeitos que este elemento pode causar em termos de toxicidade. Estudos anteriores ressaltam a importância da força iônica e do comportamento da partícula, uma vez que esta esteja em suspensão (PICCAPIETRA, SIGG, BEHRA, 2012).

Em relação às nanopartículas testadas no modelo celular tridimensional neste estudo, estas apresentaram uma mudança de comportamento, quando colocadas em meio de cultivo, específico para os hepatócitos (meio L-15 + 10 % FBS). Quando colocadas em meio L-15 sem a presença de soro bovino fetal (SBF), o tamanho dos agregados foram de ~ 20 µm e foram registrados para as duas amostras AgNPs. Desta forma, podemos considerar que foram formados aglomerados grandes, porém não podemos assumir que toda a amostra estava com a distribuição de tamanho da mesma maneira. Já quando foram colocadas em meio L-15 com adição de 10% de soro bovino fetal (SBF) as AgNPs mostraram uma mudança de coloração, provavelmente devido a uma alteração da sua composição química de superfície. O mais interessante foi que o mesmo efeito foi observado em ambas AgNPs e o pico de tamanho para ambas as amostras foi de ~410 nm.

Desta forma, a exposição dos esferoides de hepatócitos ocorreu na presença de meio L-15 + 10 % FBS e a internalização das AgNPs, bem como dos íons de prata pode ser observada pela microscopia eletrônica de transmissão e confirmada com a técnica *EDX mapping* acoplada ao equipamento. O grau de aglomeração das nanopartículas no meio de exposição a estas está correlacionado positivamente com a internalização e com a toxicidade produzida por estas (YUE *et al.*, 2014). O mecanismo de toxicidade avaliado pela funcionalidade da EROD, bem como pelos ensaios bioquímicos de *TBARS* e Glutathione Total

nos fornecerão dados suficientes para determinar o grau de toxicidade causado pelas nanopartículas de prata utilizadas neste estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie *Hoplias intermedius* mostrou-se um organismo relativamente fácil de manter em condições laboratoriais e, por ser uma espécie endêmica, possui fundamental importância para o desenvolvimento de futuros estudos de genotoxicidade e monitoramento ambiental.

A ausência de micronúcleos não necessariamente significa a ausência de efeitos genotóxicos de determinada substância. Muito provavelmente esta ausência está relacionada com a falta de algumas informações devido a algum efeito citotóxico do contaminante, ocasionando morte celular em grande escala, acarretando um efeito falso negativo. Além disso, a presença de alterações morfológicas em grande número aumenta o número de informações a respeito da ocorrência destas, bem como fornece evidências na tentativa de se elucidar os mecanismos envolvidos na formação destas.

As nanopartículas de TiO_2 produzem uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), no entanto, os danos aqui evidenciados no ensaio cometa sugerem uma outra via causadora de genotoxicidade, visto que neste trabalho não foram utilizados métodos para a quantificação de ROS e o ensaio cometa utilizado foi o ensaio cometa alcalino. Além disso, o mecanismo que atuaria neste processo diretamente sobre a molécula de DNA permanece ainda sem explicação.

Nos resultados da exposição associada de metais (chumbo e alumínio, neste caso) com as nanopartículas de TiO_2 , é possível verificar, para alguns biomarcadores tanto bioquímicos quanto genéticos, uma alteração na resposta, o que pode evidenciar uma possível interação entre os contaminantes. Um dos fatores principais responsáveis por diferentes efeitos desta exposição associada pode estar relacionado à concentração de nanopartículas em cada suspensão, bem como as cargas de superfície dessas nanopartículas e a distribuição de tamanho das mesmas.

Em relação ao uso de células de peixes na exposição às nanopartículas metálicas, estas provam ser de grande valia, pois podem fornecer informações mais precisas em relação aos mecanismos de toxicidade, bem como dados acerca da capacidade de internalização dessas nanopartículas. Além disso, o uso de células de peixes vem sendo muito recomendado devido ao grande apelo da comunidade científica para a redução ao uso de animais nas pesquisas. Desta forma, o estudo realizado com cultivo celular tridimensional de hepatócitos de peixes mostrou-se válido na tentativa de fornecer informações mais precisas à respeito da exposição às nanopartículas, bem como foi possível avaliar parâmetros mais precisos da toxicidade

destas. Em um futuro próximo, a mesma técnica aplicada poderá propiciar em peixes nativos brasileiros as mesmas avaliações e uma comparação dos dados encontrados *in vivo* até o momento.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. **Catalase in Vitro**. Methods in Enzymology, v. 105, p. 121–126, 1984.
- ADAMS, S. M. **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, 2002.
- ADAMS, W. H.; KRAMER, J.R. **Reactivity of Ag⁺ ion with thiol ligands in the presence of iron sulfide**. Environmental Toxicology and Chemistry v.17, p. 625–629, 1998.
- ADAMS, W.J.; ROWLAND, C.D. **Aquatic Toxicology Test methods** In: HOFFMAN, D.J. et al. (Ed). **Handbook of Ecotoxicology**, Boca Raton, Lewis, Cap. 02, 2002.
- Agency for Toxic Substance and Disease Registry (ATSDR), **Toxicological Profile for Lead**. U.S.Department of Healthy and Humans Services, Public Health Service, Centres for Disease Control, Atlanta, G.A., 2007.
- AGNELLO, L. M.; FILOSTO, S.; SCUDIERO, R.; RINALDI, A. M.; ROCCHERI, M. C. **Cadmium induces an apoptotic response in sea urchin embryos**. Cell Stress and Chaperones, v. 12 (1), p. 44–50, 2007.
- AITKEN, R. J.; CHAUDHRY, M. Q.; BOXALL, A. B. A.; HULL, M. **Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends**. Occupational Medicine (Oxford) 56, 300–306, 2006.
- AKAISHI, F.M. **Aplicação de Biomarcadores de contaminação ambiental em estudos de laboratório e monitoramento em campo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Curitiba, 2003.
- ALFREY, A. C. **Aluminum metabolism in uremia**. Neurotoxicology, v. 1, p. 43-53, 1980.
- ALLIN, C.J.; WILSON, R.W. **Effects of pre-acclimation to aluminium on the physiology and swimming behaviour of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during a pulsed exposure**. Aquatic Toxicology, v. 51, p. 213–224, 2000.
- ALMEIDA, J.A.; DINIZ, Y.S., MARQUES, S.F.G., FAINE, L.A., RIBAS, B.O., BURNEIKO, R.C., et al. **The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to *in vivo* cadmium contamination**. Environmental International, v. 27, p. 673–679, 2002.
- ALMROTH, B.C.; STURVE, J.; BERGLUND, A.; FÖRLIN, L. **Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparous*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers**. Aquatic Toxicology, v. 73, p. 171–180, 2005.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. **Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water**. Mutation Research, v. 343, p. 121-135, 1995.
- AMADO, L.L., ROBALDO, R.B., GERACITANO, L., MONSERRAT, J.M., BIANCHINI, A. **Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus***

(Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, p. 207–213, 2006.

ANDRIEVSKY, G.V.; KLOCHKOV, V.K...; DEREVYANCHENKO, L.I. **Is C₆₀ Fullerene Molecule Toxic?!**, *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostructures*, v. 13 (4), p. 363–376, 2005.

ANDREWS, G. K. **Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions**. *Biochemical Pharmacology*, v. 59, p. 95–104, 2000

ARKHIPCHUK, V.V.; GARANKO, N.N. **Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on *in vivo* fish fin cells**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 62, p.42-52, 2005.

ARORA, S., JAIN, J., RAJWADE, J.M., PAKNIKAR, K.M. **Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells**. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 236 (3), p. 310–318, 2009.

ASHARANI, P. V., LOW KAH MUN, G., HANDE, M.P., VALIYAVEETTIL, S. **Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells**. *ACS NANO*, v. 3(2), p. 279-290, 2009.

ATLI, G.; ALPTEKIN, O.; TÜKEL, S.; CANLI, M. **Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus***. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 143, n. 2, p. 218–224, 2006.

AU, D.W.; REUNOV, A. A; WU, R.S. **Reproductive impairment of sea urchin upon chronic exposure to cadmium. Part II: Effects on sperm development**. *Environmental Pollution*, v. 111, p. 11–20, 2001.

AYLLON, F.; GARCÍA-VAZQUEZ, E. **Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss***. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 49, p. 221-225, 2001.

AZEVEDO, F.A., CHASIN, A. A. M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, p. 322, 2003.

BABICH, H.; BORENFREUND, E. **Cultured fish cells for the ecotoxicity testing of aquatic pollutants**. *Toxicology Assessment*, v. 2, p. 119-133, 1987.

BAINY, A. C. D. **How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments**. *Ciência e Cultura*, v. 45, p.10-11, 1993.

BAKER, R.T.M., HANDY, R.D., DAVIES, S.J., SNOOK, J.C. **Chronic dietary exposure to copper affects growth, tissue lipid peroxidation, and metal composition of the grey mullet, *Chelon labrosus***. *Marine Environmental Research* v. 45, p. 357–65, 1998.

BAKER, T.J.; TYLER, C.R.; GALLOWAY, T.S. **Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms**. *Environmental Pollution*, v. 186, p. 257–271, 2014.

BANASIK, A.; LANKOFF, A.; PISKULAK, A.; ADAMOWSKA, K.; LISOWSKA, H.; WOJCIK, A. **Al induced micronuclei and apoptosis in human peripheral-blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle.** *Environmental Toxicology*, v. 20, p. 402–406, 2005.

BAR-ILAN, O.; ALBRECHT, R.M.; FAKO, V.E.; FURGESON, D.Y. **Toxicity assessments of multi-sized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos.** *Small*, v. 5, p. 1897–1910, 2009.

BARON, M.G.; PURCELL, W.M.; JACKSON, S. M.; OWEN, S.F.; JHA, A.N. **Towards a more representative in vitro method for fish ecotoxicology: morphological and biochemical characterization of three-dimensional spheroidal hepatocytes.** *Ecotoxicology*, v. 21, p. 2419–2429, 2012.

BARTRAM, A.E.; WINTER, M.J.; HUGGETT, D.B.; MCCORMACK, P.; CONSTANTINE, L.A.; HET-HERIDGE, M.J.; HUTCHINSON, T.H.; KINTER, L.B.; ERICSON, J.F.; SUMPTER, J.; OWEN, P.S.F. **In vivo and in vitro liver and gill EROD activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to the beta-blocker propranolol.** *Environmental Toxicology*, v. 27 (10), p. 573–582, 2011.

BAUN, A.; SØRENSEN, S.N.; RASMUSSEN, R.F.; HARTMANN, N.B.; KOCH, C.B. **Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C₆₀.** *Aquatic Toxicology*, v. 86, p. 379–387, 2008.

BAZZONI, B.G.; BOLLINI, N.A.; HERNÁNDEZ, G.N.; CONTINI, M.C.; CHIAROTTO, M.M.; RASIA, L.M. **In vivo effect of aluminium upon the physical properties of the erythrocyte membrane.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 99, p. 822–827, 2005.

BEHRENS, A.; SCHIRMER, K.; BOLS, N.C.; SEGNER, H. **Microassay for rapid measurement of 7-ethoxiresorufin-O-deethylase activity in intact fish hepatocytes.** *Marine Environmental Research*, v. 46, p. 369–373, 1998.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. **Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish.** *Mutation Research*, v. 415 (3), p. 167–184, 1998.

BERMUDEZ, E.; MANGUM, J.B.; WONG, B.A.; ASGHARIAN, B.; HEXT, P.M.; WARHEIT, D.B.; EVERITT, J.I. **Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles.** *Toxicological Sciences*, v. 77, p. 347–357, 2004.

BENN, T.M.; WESTERHOFF, P. **Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics.** *Environmental Science and Technology*, v. 42, p. 4133–4139, 2008.

BERNTSSEN, M.H.G.; LUNDEBYE, A.-K.; HAMRE, K. **Tissue lipid peroxidative responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Parr fed high levels of dietary copper and cadmium.** *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 23, p. 1573–1588, 2000.

BIAN, S.W.; MUDUNKOTUWA, I.A.; RUPASINGHE, T.; GRASSIAN, V.H. **Aggregation and dissolution of 4nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid.** *Langmuir*, v. 27, p. 6059–6068, 2011.

BIANCHINI, A.; WOOD, C.M. **Physiological effects of chronic silver exposure in *Daphnia magna*.** *Comparative Biochemical and Physiology*, v. 133C, p. 137–145, 2002.

BICKHAM, J.W.; S.S. SANDHU, P.D.N.; HERBERT, L.; CHIKHI, R. ANTHWAL. **Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: Implications for biomonitoring in ecotoxicology.** *Mutation Research*, v. 463, p. 33-51, 2000.

BILBERG, K.; DØVING, K.B.; BEEDHOLM, K.; BAATRUP, E. **Silver nanoparticles disrupt olfaction in Crucian carp (*Carassius carassius*) and Eurasian perch (*Perca fluviatilis*).** *Aquatic Toxicology*, v. 104, p. 145–152, 2011.

BISSELL, M.J.; HALL, H.G.; PARRY, G. **How does the extracellular matrix direct gene expression?** *Journal of Theoretical Biology*, v. 99, p. 31-68, 1982.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D.M.; SCIUTTO, A. **Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions.** *Aquatic Toxicology*, v. 78, S93–S98, 2006.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. **Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland.** *Chemosphere*, v. 44, p. 383-392, 2001.

BONDY, S.C. **The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue.** *Neurotoxicology*, v. 31, p. 575–581, 2010.

BORM, P.J.A.; ROBBINS, D.; HAUBOLD, S.; KUHLEBUSCH, T.; FISSAN, H.; DONALDSON, K.; SCHINS, R.; STONE, V.; KREYLING, W.; LADEMANN, J.; KRUTMANN, J.; WARHEIT, D.; OBERDORSTER, E. **The potential risks of nanomaterials: A review carried out for ECETOC.** *Particle and Fibre Toxicology*, v. 3, p. 11–46, 2006.

BORNSCHEIN, J., KIDD, M., MALFERTHEINER, M.V., DROZDOV, I., PFRAGNER, R., MODLIN, I.M. **Analysis of cytotoxic effects of chemotherapeutic agents on lung and small intestinal neuroendocrine cell lines.** *Journal of Cancer Molecules*, v. 4(2), p. 47–54, 2008.

BRITISH STANDARDS, BSI. **Guidance on the labelling of manufactured nanoparticles and products containing manufactured nanoparticles.** PAS 130: 2007.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRADFORD, A., HANDY, R.D., READMAN, J.W. **Impact of silver nanoparticle contamination on the genetic diversity of natural bacterial assemblages in estuarine sediments.** Environmental Science and Technology, v. 43 (12), p. 4530–4536, 2009.

BRITSKI, H.A. **Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática.** In: Poluição e Piscicultura. São Paulo: CPRN, p.79-108, 1972.

BRUNETTI, R.; MAJONE, F.; GOLLA, I.; BELTRAME, C. **The micronucleus test: examples of application to marine ecology.** Marine Ecology-Progress Series, v. 44, p. 65–68, 1988.

BUCHELI, T. D.; FENT, K. **Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems.** Critical Reviews in Environmental Science and Technology, v. 25, p. 201- 268, 1995.

BURKE, M. D.; MAYER, R. T. **Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene.** Drug Metabolism and Disposition, v. 2, p. 583–588, 1974.

BURY, N.R.; WALKER, P.A.; GLOVER, C.N. **Nutritive metal uptake in teleost fish.** Journal of Experimental Biology, v. 206, p. 11–23, 2003.

BURY, N.R.; HANDY, R.D. **Copper and iron uptake in teleost fish.** In: Handy, R.D., Bury, N. (Eds.), Essential Reviews in Experimental Biology, vol. 2. Society for Experimental Biology Press, London, p. 107–127, 2010.

CABRAL GONTIJO, A.M.M., BARRETO, R.E., SPEIT, G., REYES, V.A.V., VOLPATO, G.L., SALVADORI, D.M.F. **Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results.** Mutation Research, v. 534, p. 165–172, 2003.

CAJARAVILLE, M.P.; HAUSER, L.; CARVALHO, G.; HYLLAND, K.; OLABARRIETA, I.; LAWRENCE, A.J.; LOWE, D.; GOKSOYR, A. **Genetic damage and the molecular/cellular response to pollution.** In: **Effects of pollution on fish: molecular effects and population responses.** Ed. Lawrence, A.J. e Andrew J.; Blackwell publishers. Capítulo: 2, 2003.

CAMEJO, G.; WALLIN, B.; ENOJÄRVI, M. **Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates.** In **Free Radical and Antioxidant Protocols.** Methods in Molecular Biology, Vol. 108 (Armstrong, D., ed.), pp. 307–386. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 1998.

CAMPANA, O.; SARASQUETE, C.; BLASCO, J. **Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Holabatrachus didactylus*.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 55, p. 116-125, 2003.

CAMPBELL, P.G.C.; STOKES, P.M. **Acidification and toxicity of metals to aquatic biota.** Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 42, p. 2034–2049, 1985.

CAMPBELL, H.A.; HANDY, R.D.; NIMMO, M. **Copper uptake kinetics across the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) measured using an improved isolated perfused head technique.** Aquatic Toxicology, v. 46, p. 177– 190, 1999.

CANESI, L.; CIACCI, C.; BALBI, T. **Interactive effects of nanoparticles with other contaminants in aquatic organisms: Friend or foe?** Marine Environmental Research, v. 111, p. 128-134, 2015.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. **Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects.** Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 47, p. 2123 -2136, 1990.

CASTANO, A., VEJA, M., BLAZQUEZ, T., TARAZONA, J.V. **Biological alternatives to chemical identification for the ecotoxicological assessment of industrial effluents: the RTG-2 in vitro cytotoxicity test.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 13, p. 1607–1611, 1994.

CASTANO, A.; GOMEZ-LECHON, M.J. **Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: a literature survey.** Toxicology in Vitro, v. 19, p. 695–705, 2005.

CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L. **The fish fauna from a small forest stream of the upper Parana river basin, southeastern, Brazil.** Ichthyology Exploration of. Freshwaters, v. 7, p. 337 –352, 1997.

CASTRANOVA, V. **Overview of current toxicological knowledge of engineered nanoparticles.** Journal of Occupational and Environmental Medicine, v. 53, S14–S17, 2011.

CASTRO-GONZÁLEZ, M.I; MÉNDEZ-ARMENTA, M. **Heavy metals: Implications associated to fish consumption.** Environmental Toxicology and Pharmacology, v.26, p. 263–271, 2008.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. **Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining.** Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 19, p. 107-111, 2005 a.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. **Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents.** Aquatic Toxicology, v.74, p.264–271, 2005 b.

ÇAVAS, T.; GARANKO N.N.; ARKHIPCHUK, V.V. **Induction of micronuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate.** Food and Chemical Toxicology, v. 43, p. 569-574, 2005 c.

ÇAVAS, T. **In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: micronucleus test on acridine orange stained fish cells.** Food and Chemical Toxicology, v. 46, p. 352–358, 2008.

CELIK, A., CAVAS, T., ERGENE-GOZUKARA, S. **Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells.** Mutagenesis, v. 18, p.417–721, 2003.

CESTARI, M.M., LEMOS, P.M.M.; RIBEIRO, C.A.O., COSTA, J.R.M.A., PELLETIER, E., FERRARO, M.V.M.; MANTOVANI, M.S., FENOCCHIO, A.S. **Genetic damage induced**

by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. Genetics and Molecular Biology, v. 27 (2), p. 270-274, 2004.

CHAE, Y.J.; C.H. PHAM, J. LEE, E. BAE, J. YI, M.B. GU. **Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*).** Aquatic Toxicology, v. 94, p. 320–327, 2009.

CHANG, T.T.; HUGHES-FULFORD, M. **Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes.** Tissue Engineering - Part A, v. 15, p. 559–567, 2009.

CHITHRANI, B.D.; GHAZANI, A.A.; CHAN, W.C.W. **Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells.** Nano Letters, v. 6, p. 662–668, 2006.

CHO, M.; CHUNG, H.; CHOI, W.; YOON, J. **Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection.** Water Research, v. 38, p. 1069–1077, 2004.

CLEARWATER, S.J., FARAG, A.M., MEYER, J.S. **Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish.** Comparative Biochemistry and Physiology - Part C, v. 132, p. 269–313, 2002.

CLEMENTE Z.; CASTRO, V.L.; JONSONN, C.M.; FRACETO, L.F. **Ecotoxicology of nano-TiO₂ — an evaluation of its toxicity to organism of aquatic ecosystems.** International Journal of Environmental Research, v. 6 (1), p. 33–50, 2012.

CLEMENTE, Z. CASTRO, V.L.; FEITOSA, L.O.; LIMA, R.; JONSONN, C.M.; MAIA, A.H.N.; FRACETO, L.F. **Fish exposure to nano-TiO₂ under different experimental conditions: Methodological aspects for nanoecotoxicology investigations.** Science of the Total Environment, v. 463-464, p. 647 – 656, 2013.

COLLINS, A; DUŠINSKÁ, M; FRANKLIN, M; SOMOROVSKÁ, M; PETROVSKÁ, H; DUTHIE, S; FILLION, L; PANAYIOTIDIS, M; RAŠLOVÁ, K; VAUGHAN, N. **Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications.** Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 30(2), p. 139-146, 1997.

COLVIN, V.L., **The potential environmental impact of engineered nanomaterials.** Nature Biotechnology, v. 21, p. 1166-1170, 2003.

CORREIA, T.G.; NARCIZO, A.M.; BIANCHINI, A.; MOREIRA, R.G. **Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, v. 151, p. 461–466, 2010.

CORSI, I.; CHERR, G.N.; LENIHAN, H.S.; LABILLE, J.; HASSELLOV, M.; CANESI, L.; DONDERO, F.; FRENZILLI, G.; HRISTOZOV, D.; PUNTES, V.; DELLA TORRE, C.; PINSINO, A.; LIBRALATO, G.; MARCOMINI, A.; SABBIONI, E.; MATRANGA, V. **Common strategies and technologies for the ecosafety assessment and design of nanomaterials entering the marine environment.** ACS Nano, v. 8, p. 9694-9709, 2014.

CRAVEDI, J.P., PARIS, A., MONOD, G., DEVAUX, A., FLOURIOT, G., VALOTAIRE, Y. **Maintenance of cytochrome P450 content and phase I and phase II enzyme activities in trout hepatocytes cultured as spheroidal aggregates.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 113 (2), p. 241–246, 1996.

CRISWELL, K.A.; KRISHNA, G.; ZIELINSKI, D.; URDA, G.A.; THEISS, J.C.; JUNEAU, P.; BLEAVINS, M.R. **Use of acridine orange in flow cytometric: assessment of micronuclei induction.** *Mutation Research*, v. 414, p. 63–75, 1998.

DANG, Z., LOCK, R.A.C., FLIK, G., WENDELAAR BONGA, S.E. **Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water.** *American Journal of Physiology*, v. 277, p. 320–331, 1999.

DALZELL, D.J.B.; MACFARLANE, N.A.A. **The toxicity of iron to brown trout and effects on the gills: a comparison of two grades of iron sulphate.** *Journal of Fish Biology*, v. 55, p. 301–315, 1999.

DAS, R.K.; NANDA, N.K. **Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of the fish, *Heteropneustes fossilis*, by mitomycin C and paper mill effluent.** *Mutation Research*, v. 175, p. 67–71, 1986.

DAUGHTON, C.G. **Non-regulated water contaminants: emerging research.** *Environmental Impact Assessment Reviews*, v. 24, p. 711–732, 2004.

DAVIES, P.H., GOETTL JR., J.P., SMILEY, J.R. **Toxicity of silver to rainbow trout.** *Water Research*, v. 12, p. 1113–1117, 1978.

DHAWAN, A., SHARMA, V. **Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 398, p. 589–605, 2010.

DAYEH, V. R., SCHIRMER, K., BOLS, N. C. **Applying whole-water samples directly to fish cell cultures in order to evaluate the toxicity of industrial effluent.** *Water Research*, v. 36, p. 3727–3738, 2002.

DEL BARGA, I.; FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; NIGRO, M.; MALMVÄRN, A.; ASPLUND, L.; FÖRLIN, L.; STURVE, J. **Effects of algal extracts (*Polysiphonia fucooides*) on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a biomarker approach.** *Marine Environmental Research*, v. 62 (1), p. S283–286, 2006.

DEVAUX, A.; PESONEN, M.; MONOD, G. **Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes.** *Toxicology in Vitro*, v. 11, p. 71–79, 1997.

DEVOTO, E.; YOKEL, A.R. **The biological speciation and toxicokinetics of Al.** *Environmental Health Perspective*, v. 102, p. 940–951, 1994.

DE VRIES, W.; ROMKENS, P.F.A.M.; VAN LEEUWEN, T.; BRONSWIJK, J.J.B. Heavy metals. In: **Agriculture, Hydrology and Water Quality**, CAB International Eds: P. M. HAYGHART and S. C.JARVIS, 2002.

DINNEN, R.D.; TOMLINSON, S.M.; HART, D.; CHOPRA, C.; HEDDLE, J.A. **Application of a micronucleus assay to the peripheral blood cells of rainbow trout, *Salmo gairdneri*.** Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 1607, p. 69–78, 1988.

DOBSON, C.B., DAY, J.P., KING, S.J., ITZHAKI, R.F. **Location of aluminium and gallium in human neuroblastoma cells treated with metal-chelating agent complexes.** Toxicology and Applied Pharmacology, v. 152, p. 145–152, 1998.

DONALDSON, K.; STONE, V.; GILMOUR, P.S.; BROWN, D.M.; MACNEE, W. **Ultrafine particles: Mechanisms of lung injury.** Philosophical Transactions of the Royal Society, v. 358, p. 2741–2749, 2000.

DONALDSON, K.; STONE, V.; SEATON, A.; MACNEE, W. **Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms.** Environmental and Health Perspective, v. 109 (4), p. 523–527, 2001.

DONALDSON, K., BORM, P.J., CASTRANOVA, V., GULUMIAN, M. **The limits of testing particle-mediated oxidative stress *in vitro* in predicting diverse pathologies; relevance for testing of nanoparticles.** Particle and Fibre Toxicology, v. 6, p. 13–20, 2009.

DOWLING, K.; MOTHERSILL, C. **The further development of rainbow trout primary epithelial cell cultures as a diagnostic tool in ecotoxicology risk assessment.** Aquatic Toxicology, v. 53, p. 279–290, 2011.

DRAKE, P.L.; HAZELWOOD, K.J. **Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review.** The Annals of Occupational Hygiene, v.49, p. 575–585, 2005.

DUFFUS, J.H. Chemistry International, v.23, n°6. Disponível em <http://www.iupac.org/publications/pac/2002/pdf/7405x0793.pdf>. Acessado em 24/08/2015.

DURAL, M., GOKSU, M.Z.L., OZAK, A.A. **Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon.** Food Chemistry, v. 102, p. 415–421, 2007.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. J.; FEATHERSTONE, R. M. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** Biochemical Pharmacology, v. 7, p. 88–95, 1961.

ELOVAARA, E.; HEIKKILA, P.; PYY, L.; MUTANEN, P.; RIIHIAMKI, V. **Significance of dermal and respiratory uptake in creosote workers: exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and urinary excretion of 1-hydroxypyrene.** Occupational and Environmental Medicine, v. 52, p. 192–203, 1995.

EPA, United States Environmental Protection Agency: Report on the Environment: Science Report, 2007. <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=140917>. Acessado em 28/05/2015.

ERGENE, S.; ÇAVAS, T.; CELIK, A.; KOLELI, N.; KAYA, F.; KARAHAN, A. **Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species**

from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*, v. 16, p. 385–391, 2007.

ERICKSON, R.J.; BROOKE, L.T.; KAHL, M.D.; VANDE VENTER, F.; HARTING, S.L.; MARKEE, T.P.; STEPHAN, C.; SPEHAR, R. **Effects of laboratory test conditions on the toxicity of silver to aquatic organisms.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 17, p. 572–578, 1998.

ESCHER, B.I.; SIGG, L. Chemical speciation of organics and of metals at biological interfaces. In: van Leeuwen HP, Köster W, editors. **Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces.** West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd; p. 205–69, 2004.

ESPINA, N.G.; WEISS, P. **DNA repair in fish from polluted estuaries.** *Marine Environmental Research*, v. 39, p. 309–312, 1995.

ESTERBAUER, H. Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. In: **Free Radicals in Liver Injury** (Poli G, Cheeseman KH, Dianzani MU, Slater TF, eds). Oxford: IRL Press, 29–47, 1984.

EXLEY, C. **Aluminium in the brain and heart of the rainbow trout.** *Journal of Fish Biology*, v. 48, p. 706–713, 1996.

EXLEY, C.; PINNEGAR, K.J.; TAYLOR, H. **Hydroxyaluminosilicates and acute aluminium toxicity in fish.** *Journal of Theoretical Biology*, v. 189, p. 133–139, 1997.

FABBENDER, C.; BRAUNBECK, T. **Assessment of genotoxicity in gonads, liver and gills of zebrafish (*Danio rerio*) by use of the comet assay and micronucleus test after *in vivo* exposure to methyl methanesulfonate.** *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 91 (1), p. 89–95, 2013.

FARKAS, J.; CHRISTIAN, P.; URREA, J.A.G.; ROOS, N.; HASSELLÖV, M.; TOLLEFSEN, K.E.; THOMAS, K.V. **Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells.** *Aquatic Toxicology*, v. 101(1), p. 117–125, 2011.

FARKAS, J.; CHRISTIAN, P.; URREA, J.A.G.; ROOS, N.; HASSELLÖV, M.; TOLLEFSEN, K.E.; THOMAS, K.V. **Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes.** *Aquatic Toxicology*, v. 96, p. 44–52, 2010.

FARRÉ, M.; GAJDA-SCHRANTZ, K.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. **Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 393, p. 81–95, 2009.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. **Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress and other physiological effects.** *Aquatic Toxicology*, v. 84, p. 415–430, 2007.

FENECH, M. **The *in vitro* micronucleus technique.** *Mutation Research*, v. 455, p. 81–95, 2000.

FENOGLIO, I., GRECO, G., LIVRAGHI, S., FUBINI, B. **Non-UV-induced radical reactions at the surface of TiO₂ nanoparticles that may trigger toxic responses.** Chemistry - A European Journal, v. 15, p. 4614–4621.

FERNANDEZ, N.; BEIRAS, R. **Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea urchin.** Ecotoxicology, v. 10, p. 263–271, 2001.

FERNÁNDEZ-DÁVILA, M.L.; RAZO-ESTRADA, A.C.; GARCÍA-MEDINA, S.; GÓMEZ-OLIVÁN, L.M.; PIÑÓN-LÓPEZ, M.J.; IBARRA, R.G.; GALAR-MARTÍNEZ, M. **Aluminum-induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (*Cyprinidae-Ctenopharingodonidella*).** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 76, p. 87–92, 2012.

FERRARO, M V M; FENOCCHIO, A S; MANTOVANI, M S; OLIVEIRA RIBEIRO, C; CESTARI, M M. **Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromossome aberration tests.** Genetics and Molecular Biology, v. 27 (1), p. 103-107, 2004.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.; D`ANGELO, A. M. P. **Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*).** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 57 (3), p. 420-425, 2004.

FLEEGER, J.W., CARMAN, K.R., NISBET, R.M. **Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems.** Science of Total Environment, v. 317 (1–3), p. 207–233, 2003.

FLORA, S.J.S.; MEHTA, A.; SATSANGI, K.; KANNAN, G.H.; GUPTA, M. **Aluminum induced oxidative stress in rat brain: response to combined administration of citric acid and HEDTA.** Comparative Biochemistry and Physiology, part C, v. 134, p. 319–328, 2003.

FLOURIOT, G., MONOD, G., VALOTAIRE, Y., DEVAUX, A., CRAVEDI, J.P. **Xenobiotic metabolizing enzyme activities in aggregate culture of rainbow trout hepatocytes.** Marine Environmental Research, v. 39(1–4), p. 293–297, 1995.

FRACASSO, M.E.; PERBELLINI, L.; SOLDI, S.; TALAMINI, G.; FRANCESCHETTI, P. **Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C.** Mutation Research, v. 515, p. 159–169, 2002.

FRASCO, M.F., FOURNIER, D., CARVALHO, F., GUILHERMINO, L. **Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity.** Biomarkers, v. 10, p. 360–375, 2005.

FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; DEL BARGA, I. et al. **DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour.** Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 552 (1-2), p. 187-95, 2004.

FRENZILLI, G.; FALLEN, A.; SCARCELLI, V.; DEL BARGA, I.; NIGRO, M.; FÖRLIN, L.; BOLOGNESI, C.; STURVE, J. **Cellular responses in the cyprinid *Leuciscus cephalus***

from a contaminated freshwater ecosystem. *Aquatic Toxicology*, v. 89, n. 3, p. 188-96, 2008.

FOLDBJERG, R.; OLESEN, P.; HOUGAARD, M.; DANG, D.A.; HOFFMANN, H.J.; AUTRUP, H. **PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes.** *Toxicology Letters*, v. 190(2), p. 156–162, 2009.

FOLDBJERG, R.; DANG, D.; AUTRUP, H. **Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line A549.** *Archives of Toxicology*, v. 85, p. 743–750, 2011.

FOLKMAN, J.; HOCHBERG, M. **Self-regulation of growth in 3 dimensions.** *Journal of Experimental Medicine*, v. 138, p. 745–753, 1973.

FU, H.; BOFFETTA, P. **Cancer and occupational exposure to inorganic lead compounds: a meta-analysis of published data.** *Occupational and Environmental Medicine*, v. 52, p. 73–81, 1995.

GAGNÉ, F.; ANDRÉ, C.; SKIRROW, R.; GÉLINAS, M.; AUCLAIR, J.; VAN AGGELEN, G.; TURCOTTE, P.; GAGNON, C. **Toxicity of silver nanoparticles to rainbow trout a toxicogenomic approach.** *Chemosphere*, v. 89, p. 615–622, 2012.

GAISER, B.K.; FERNANDES, T.F.; JEPSON, M.; LEAD, J.R.; TYLER, C.R.; STONE, V. **Assessing exposure, uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles from contaminated environments.** *Environmental Health*, v.8 (1):, S2, p. 1-4, 2009.

GALAR-MARTÍNEZ, M.; GÓMEZ-OLIVÁN, L.M.; AMAYA-CHÁVEZ, A.; RAZO-ESTRADA, C.; GARCÍA-MEDINA, S. **Oxidative stress induced on *Cyprinus carpio* by contaminants present in the water and sediment of Madín reservoir.** *Journal of Environmental Science and Health - Part A*, v. 45(2), p. 875–882, 2010.

GALINDO, B.A.; TROILO, G.; CÓLUS, I.M.S.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. **Genotoxic effects of aluminum on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*.** *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 212, p. 419–428, 2010.

GALLO, M. e LAWRYK, N. **Organic Phosphorus Pesticides.** In Hayes, W.J, Laws, E. R. **Handbook of Pesticide Toxicology.** San Diego, California, USA. Academic Press, Inc., 2, p. 917-1124, 1991.

GANROT, R. **Metabolism and Possible Health Effects of Aluminum.** *Environmental Health Perspectives*, v. 65, p. 363-441, 1986.

GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z.; GAO, X. **Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity.** *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 45, n. 1, p. 41–45, 1998.

GARCÍA-LESTÓN, J., MÉNDEZ, J., PÁSARO, E., LAFFON, B. **Genotoxic effects of lead: An updated review.** *Environmental International*, v. 36, p.623–63, 2010.

GARCÍA-MEDINA, S.; RAZO-ESTRADA, A.C.; GÓMEZ-OLIVÁN, L.M.; AMAYA-CHÁVEZ, A.; MADRIGAL-BUJADAR, E.; GALAR-MARTÍNEZ, M. **Aluminum-induced oxidative stress in lymphocytes of common carp (*Cyprinus carpio*)**. Fish Physiology and Biochemistry, v. 36, p. 875–882, 2010.

GARZA, A.; CHÁVEZ, H.; VEJA, R.; SOTO, E. **Mecanismos celulares y moleculares de la neurotoxicidad por plomo**. Salud Mental, v. 28, p. 48–58, 2005.

GERANIO, L.; HEUBERGER, M.; NOWACK, B. **The behavior of silver nanotextiles during washing**. Environmental Science and Technology, v. 43, p. 8113–8118, 2009.

GEISER, M.; B. ROTHEN-RUTISHAUSER, N. KAPP, S. SCHURCH, W. KREYLING, H. SCHULZ, M. SEMMLER, H. IM, V.J. HEYDER, P. GEHR. **Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells**. Environmental Health Perspective, v. 113, p.1555–1560, 2005.

GICHNER, T.; MUKHERJEE, A.; WAGNER, E. D.; PLEWA, M. J. **Evaluation of the nuclear DNA Diffusion Assay to detect apoptosis and necrosis**. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 586, n. 1, p. 38-46, 2005.

GILES, M.A. **Electrolyte and water balance in plasma and urine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during chronic exposure to cadmium**. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, v.41, p. 1678–85, 1984.

GILLIAN, J.F.; FRASER, D.F. **Movement in corridors: Enhancement by predation threat, disturbance, and habitat structure**. Ecology, v. 82, p. 258-273, 2001.

GOKSOYR, A.; ANDERSON, T.; BUHLER, D.R.; STEGEMAN, J.J.; WILLIAMS, D.E.; FORLIN, L. **Immunochemical cross-reactivity of β -naphthoflavone – inducible cytochrome P450 in liver microsomes from different fish species and rat**. Fish Physiology, v. 9, p. 1-13, 1991a.

GOKSOYR, A.; SOLBERG, T.;SERIGSTAD, B. **Immunochemical detection of cytochrome P4501A induction in cod larvae and juveniles exposed to a water soluble fraction of North Sea crude oil**. Marine Pollution Bulletin, v.22, p.122-127, 1991b.

GOLBAMAKI, N., RASULEV, B., CASSANO, A., MARCHESE ROBINSON, R.L., BENFENATI, E., LESZCZYNSKI, J., CRONIN, M.T.D. **Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: review of recent data and discussion of possible mechanisms**. Nanoscale, v. 7, p. 2154-2198, 2015.

GOMEZ, C. F., CONSTANTINE, L., HUGGETT, D. B. **The influence of gill and liver metabolism on the predicted bioconcentration of three pharmaceuticals in fish**. Chemosphere, v. 81, p. 1189–1195, 2010.

GONÇALVES, P.P.; SILVA, V.S. **Does neurotransmission impairment accompany aluminium neurotoxicity?** Journal of Inorganic Biochemistry, v. 101, p. 1291–133, 2007.

GONZÁLEZ, M.A.; ROMA, M.G.; BERNAL, C.A.; ÁLVAREZ, M.L.; CARRILLO, M.C. **Biliary secretory function in rats chronically intoxicated with aluminum.** Toxicological Sciences, v. 79, p. 189–195, 2004.

GORBI, S.; REGOLI, F. **Induction of cytochrome P450 1A and biliary PAH metabolites in European eel *Anguilla anguilla*: seasonal, dose- and time–response variability in field and laboratory conditions.** Marine Environmental Research, v. 58, p. 511–515, 2004.

GORMICAN, A. **Inorganic elements in foods used in hospital menus.** Journal of the American Dietetic Association, v. 56, p. 397–403, 1970.

GOTTSCHALK, F., SONDERER, T., SCHOLZ, R.W., NOWACK, B. **Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions.** Environmental Science and Technology, v. 43, p. 9216–9222, 2009.

GOTTSCHALK, F.; SUN, T.; NOWACK, B. **Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies.** Environmental Pollution, v.181, p.287–300, 2013.

GREGAS, M.K.; F. YAN, J. SCAFFIDI, H.N. WANG, T. VO-DINH. **Characterization of nanoprobe uptake in single cells: Spatial and temporal tracking via SERS labeling and modulation of surface charge.** Nanomedicine, v. 7 (1), p.115–122, 2010.

GREGER, J.L. **Aluminium metabolism.** Annual Review of Nutrition, v. 13, p. 43–63, 1993.

GRIFFITT, R.J.; LUO, J.; GAO, J.; BONZONGO, J.C.; BARBER, D.S. **Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 27, p. 1972–1978, 2008.

GRIFFITT, R.J.; HYNDMAN, K.; DENSLOW, N.D.; BARBER, D.S. **Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles.** Toxicological Sciences, v. 107, p. 404–415, 2009.

GRILLO, R.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. **Engineered nanoparticles and organic matter: a review of the state-of-the-art.** Chemosphere, v. 119C, p. 608–619, 2014.

GRIPPO, M.A.; HEATH, A.G. **The effect of mercury on the feeding behaviour of fathead minnows (*Pimephales promelas*).** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 55, p.187–198, 2003.

GRISOLIA, C.K.; CORDEIRO, C.M.T. **Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish.** Genetics and Molecular Biology, v. 23 (1), p. 235–239, 2000.

GROSELL, M., BRAUNER, C.J., KELLY, S.P., MCGEER, J.C., BIANCHINI, A., WOOD, C.M., **Physiological response to acute silver exposure in the freshwater cray- fish (*Cambarus* sp.)—a model invertebrate?** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 21, p. 369– 374, 2002.

GONDIKAS, A.P., VON DER KAMMER, F., REED, R.B., WAGNER, S., RANVILLE, J.F., HOFFMANN, T. **Release of TiO₂ nanoparticles from sunscreens into surface waters: a one- year survey at the old Danube recreational lake.** Environmental Science and Technology, v. 48, p. 5415-5422, 2014.

GOTTSCHALK, F.; SONDERER, T.; SCHOLZ, R.W.; NOWACK, B. **Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions.** Environmental Science and Technology, v. 43, p. 9216–9222, 2009.

GUCHELAAR, H. J.; VERMES, A.; VERMES, I.; HAANEN, C. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy. **Pharmacy World & Science (PWS)**, v. 19, n. 3, p. 119-25, 1997.

GURR, J.; WANG, A.S.S.; CHEN, C.; JAN, K. **Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells.** Toxicology, v. 213, p. 66–73, 2005.

GUSTAVINO, B.; SCORNAJJENGHI, K.A.; MINISSI, S.; CICCOTTI, E. **Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X- Ray and colchicine.** Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 494, p. 151-159, 2001.

HAI, D.Q.; VARGA, I.S.; MATKOVICS, B. **Effects of an organophosphate on the antioxidant systems of fish tissues.** Acta Biologica Hungarica, v. 46, p. 39-50, 1995.

HAMPTON, J.A., LANTZ, R.C., GOLDBLATT, P.J., LAUREN, D.J., HINTON, D.E. **Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) liver. II. The biliary system.** The Anatomical Record, v. 221, p. 619-634, 1988.

HAN, X., NABB, D.L., YANG, C.H., SNAJDR, S.I., MINGOIA, R.T. **Liver microsomes and S9 from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Comparison of basal-level enzyme activities with rat and determination of xenobiotic intrinsic clearance in support of bioaccumulation assessment.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 28, p. 481–488, 2009.

HANDY, R. D., & EDDY, F. B. **Effects of inorganic cations on Na⁺ adsorption to the gill and body surface of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in dilute solutions.** Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 48, p. 1829–1837, 1991.

HANDY, R.D.; EDDY, F.B. **Surface absorption of aluminium by gill tissue and body mucus of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at the onset of episodic exposure.** Journal of Fish Biology, v. 34, p. 865–874, 1989.

HANDY, R.D., SIMS, D.W., GILES, A., CAMPBELL, H.A., MUSONDA, M.M. **Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper.** Aquatic Toxicology, v. 47, p. 23–41, 1999.

HANDY, R.D.; EDDY, F.B. Transport of solutes across biological membranes in eukaryotes: an environmental perspective. In: van Leeuwen HP, Koster W (eds) **Physicochemical kinetics and transport at chemical–biological interphases**, IUPAC series. John Wiley, Chichester, p. 337–356, 2004.

HANDY RD, MCGEER JC, ALLEN HE, DREVNICK PE, GORSUCH JW, GREEN AS, et al. Toxic effects of dietborne metals: laboratory studies. In: Meyer JS, Adams WJ, Brix KV, Luoma SN, Mount DR, Stubblefield WA, Wood CM, editors. **Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms**. Pensacola, FL, USA: SETAC Press; 2005. p. 59-112

HANDY, R. D.; HENRY, T.B.; SCOWN, T.M.; JOHNSTON, B.D.; TYLER, C.R. **Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish - a mechanistic analysis**. Ecotoxicology, v. 17, p. 396–409, 2008a

HANDY, R.D.; VON DER KAMMER, F.; LEAD, J.R.; HASSELLÖV, M.; OWEN, R.; CRANE, M. **The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles**. Ecotoxicology, v. 17, p. 287–314. 2008b.

HANDY, R. D.; AL-BAIRUTY, G.; AL-JUBORY, A.; RAMSDEN, C.S.; BOLY, D.; SHAW, B.J.; HENRY, T.B. **Effects of manufactured nanomaterials on fishes: a target organ and body systems physiology approach**. Journal of Fish Biology, v. 79, p. 821-853, 2011.

HANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 159-161, 2004.

HAO, L.; WANG, Z.; XING, B. **Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*)**. Journal of Environmental Sciences, v. 21, p. 1459-1466, 2009.

HARTWIG, A.; SCHLEPEGRELL, R.; BEYERSMANN, D. **Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells**. Mutation Research, v. 241, p. 75–82, 1990.

HARTWIG, A. **Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review**. Environmental Health Perspective, v. 102 (3), p. 45–50, 1994.

HARTWIG, A.; **Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition**. Toxicology Letters, v. 102-103, p. 235-239, 1998.

HARTWIG, A., ASMUSS, M., BLESSING, H., HOFFMANN, S., JAHNKE, G., KHANDELWAL, S., et al **Interference by toxic metal ions with zinc-dependent pro- teins involved in maintaining genomic stability**. Food and Chemical Toxicology, v. 40, p. 1179–1184, 2002.

HAYASHI, M; SOFUNI, T; ISHIDATE JR., M. **An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test**. Mutation Research, v. 120, p. 241-247, 1983.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y.

Development of genotoxicity assays systems that use aquatic organisms. Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 399 (2), p. 125-133, 1998.

HEDDLE, J.A. **A rapid in vivo test for chromosome damage.** Mutation Research, v. 18, p.187-190, 1973.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPRAIS, PH.; MACGREGOR, J. T. **Micronuclei as an index of Cytogenetic Damage: past, present and future.** Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 18, p. 277 – 291, 1991.

HELLSTRAND, E., LYNCH, I., ANDERSSON, A., DRAKENBERG, T., DAHLBACK, B., DAWSON, K. A., LINSE, S., CEDERVALL, T. **Complete high-density lipoproteins in nanoparticle corona.** FEBS Journal, v. 276, p. 3372–3381, 2009.

HERNBERG, S. **Lead poisoning in a historical perspective.** American Journal of Industrial Medicine, v. 38, p. 244–254, 2000.

HILL, W.R. **Argyria: the pharmacology of silver.** Southern Medical Journal, v. 34: 340, 1941.

HIRAKAWA, K.; MORI, M.; YOSHIDA, M.; OIKAWA, S.; KAWANISHI, S. **Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide.** Free Radical Research, v. 38, p. 439–447, 2004.

HOFFMAN, M. R., MARTIN, S. T., CHOI, W., AND BAHNEMANN, D. W. **Environmental applications of semiconductor photocatalysis.** Chemical Reviews, v. 95, p. 69–96, 1995.

HOGSTRAND, C.; HAUX, C. **Metallothionein as an indicator of heavy metal exposure in two subtropical fish species.** Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v.138, p. 69–84, 1990.

HOOFTMAN, R. N.; de RAAT, W. K. **Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate.** Mutation Research, v. 104, p.147–152, 1982.

HORVÁTHOVÁ, E.; SLAMENOVÁ, D.; HLINCÍKOVÁ, L.; MANDAL, T.K.; GÁBELOVÁ, A.; COLLINS, A.R. **The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay.** Mutation Research – DNA Repair, v. 409, p. 163-171, 1998.

HOUK, V.S. **The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review.** Mutation Research, v. 277, p. 91-138, 1992.

HOYLE, I.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. **Dietary copper exposure in the African walking catfish, *Clarias gariepinus*: transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress.** Aquatic Toxicology, v. 83, p. 62– 72, 2007.

HU, L.; Z.W. MAO, C.Y. GAO. **Colloidal particles for cellular uptake and delivery**. J. Mater. Chem, v. 19, p. 3108–3115, 2009.

HU, J., WANG, D., WANG, J., WANG, J. **Toxicity of lead on *Ceriodaphnia dubia* in the presence of nano-CeO₂ and nano-TiO₂**. Chemosphere. v. 89, p. 536–541, 2012.

HUANG, C.C., ARONSTAM, R.S., CHEN, D., HUANG, Y. **Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles**. Toxicol in Vitro, v. 24, p. 45–55, 2010.

HUGGETT, R. J.; KIMERIE, R. A.; MEHRIE Jr., P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.

HUSSAIN, S.M.; HESS, K.L.; GERHARDT, J.M.; GEISS, K.T.; SCHLAGER, J. J. **In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells**. Toxicology in Vitro, v. 19, p. 975–983, 2005.

HUSSAIN, S.; BOLAND, S.; BAEZA-SQUIBAN, A.; HAMEL, R.; THOMASSEN, L.C.; MARTENS, J.A.; BILLON-GALLAND, M.A.; FLEURY-FEITH, J.; MOISAN, F.; PAIRON, J.C.; MARANO, F. **Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount**. Toxicology, v. 260, p. 142–149, 2009.

IARC (International Agency for Research on Cancer). **Lead and lead compounds**, Inorganic, Vol. 23 (Suppl. 7). Lyon: IARC Monographs; 1987.

IARC (International Agency for Research on Cancer). **Inorganic and organic lead compounds**. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans volume. Lyon: IARC; 2006.

JAROENWORALUCK, A.; SUNSANEYAMETHA, W.; KOSACHAN, N.; STEVENS, R. **Characteristics of silica-coated TiO₂ and its UV absorption for sunscreen cosmetic applications**. Surface and Interface Analysis, v. 38, p. 473–477, 2005.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. **Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein**. Analytical Biochemistry, v. 202, (2), p. 384–389, 1992.

JIN, Y.; KANNAN, S.; WU, M.; ZHAO, J.X. **Toxicity of luminescent silica nanoparticles to living cells**. Chemical Research Toxicology, v. 20(8), p. 1126–1133, 2007.

JENNETTE, K. W. **The role of metals in carcinogenesis: biochemistry and metabolism**. Environmental Health Perspective, Research Triangle Park, v. 40, p. 233–252, 1981.

JHA, A. **Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview**. Mutation Research, v. 552, p. 1–17, 2004.

JOHANNING K, HANCOCK G, ESCHER B, ADEKOLA A, BERNHARD MJ, COWAN-ELLSBERRY C, DOMORADZKI J, DYER S, EICKHOFF C, EMBRY M, ERHARDT S,

FITZSIMMONS P, HALDER M, HILL J, HOLDEN D, JOHNSON R, RUTISHAUSER S, SEGNER H, SCHULTZ I, NICHOLS J. **Assessment of Metabolic Stability Using the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Liver S9 Fraction.** Current Protocols in Toxicology, Chapter 14:Unit14.10, 2012.

JOHNSON, F.M. **The genetic effects of environmental lead.** Mutation Research, v. 410, p. 123-140, 1998.

JOHNSON, V.J.; KIM, S.H.; SHARMAN, R.P. **Al-maltolate induces apoptosis and necrosis in neuro-2^a cells: potential role for p53 signaling.** Toxicological Sciences, v. 83, p. 329–339, 2005.

JOHNSTON, B.D.; SCOWN, T.M.; MOGER, J.; CUMBERLAND, S.A.; BAALOUSHA, M.; LINGE, K.; VAN AERLE, R.; JARVIS, K.; LEAD, J.R.; TYLER, C.R. **Bioavailability of Nanoscale Metal Oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to Fish.** Environmental Science and Technology, v. 44, (3), p. 1144–1151, 2010.

JU-NAM, Y; LEAD, J. R. **Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications.** Science of the Total Environment, v. 400, p. 396–414, 2008.

KASHIWADA, S., **Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*).** Environmental Health Perspective, v. 114, p. 1697–1702, 2006.

KAWATA, K.; OSAWA, M.; OKABE, S. **In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells.** Environmental Science and Technology, v. 439 (15), p. 6046–6051, 2009.

Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B. **Mechanism for several activities of the glutathione S-transferase.** Journal of Biological Chemistry, v. 251, p. 6183–6188, 1976.

KETTIGER, H., SCHIPANSKI, A., WICK, P., HUWYLER, J. **Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism.** International Journal of Nanomedicine, v. 8, p. 3255–3269, 2013.

KIENZLER, A.; TRONCHÈRE, X.; DEVAUX, A.; BONY, S. **Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay.** Toxicology in Vitro, v. 26, p. 500–510, 2012.

KIENZLER, A.; BONY, S.; DEVAUX, A. **DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: A review.** Aquatic Toxicology, v. 134-135, p. 47-56, 2013.

KILEMADE, M.F., HARTL, M.G.J., SHEEHAN, D., MOTHERSILL, C., VAN PELT, F.N.A.M., O'HALLORAN, J., O'BRIEN, N.M. **Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the Comet assay.** Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 44, p. 56–64, 2004.

KIM, IY; HYUN, CK. **Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 64, p. 288-297, 2006.

KIM, S.; CHOI, J.E.; CHOI, J.; CHUNG, K.H.; PARK, K.; YI, J.; RYU, D.Y. **Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells.** Toxicology in Vitro, v. 23, p. 1076–1084, 2009.

KLAINE, S.J., ALVAREZ, P.J.J., BATLEY, G.E., FERNANDES, T.F., HANDY, R.D., LYON, D.Y., MAHENDRA, S., MCLAUGHLIN, M.J., LEAD, J.R. **Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 27, p. 1825–1851, 2008.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖN, G. **The comet assay: mechanisms and technical considerations.** Mutation Research – DNA Repair, v. 363, p. 89-96, 1996.

KLEMZ, C.; SILVA DE ASSIS, H. C. **Effects of endosulfan on acetylcholinesterase activity of “Cascudo” (*Ancistrus multispinnis*, Fish, Teleostei).** Revista Acadêmica, v.3, p. 51–58, 2005.

KOLESNICHENKO, A.V.; TIMOFEEV, M.A.; PROTOPOPOVA, M.V. **Toxicity of Nanomaterials: 15 Years of Studies.** Ros. Nanotekhnol., v. 3, no. 3-4, p. 54–61, 2008.

KREYLING, W.G.; SEMMLER-BEHNKE, M.; MÖLLER, W. **Health implications of nanoparticles.** Journal of Nanoparticle Research, v. 8, p.543–562, 2006.

KRYSANOV, E.Y.; PAVLOV, D.S.; DEMIDOVA, T.B.; DGEBUADZE, Y.Y. **Effect of Nanoparticles on Aquatic Organisms.** Biology Bulletin, v. 37, (4), p. 406–412, 2010.

LABAN, G.; NIES, L.; R. TURCO, J. BICKHAM, M. SEPULVEDA. **The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos.** Ecotoxicology, v. 19, p. 185–195, 2010.

LAM, C.W.; JAMES, J.T.; MCCLUSKEY, R.; AREPALLI, S.; HUNTER, R.L. **A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks.** Critical Reviews in Toxicology, v. 36, p.189-217, 2006.

LAN, S.-F.; STARLY, B. **Alginate based 3D hydrogels as an in vitro co-culture model platform for the toxicity screening of new chemical entities.** Toxicology and applied pharmacology, v. 256, (1), p. 62–72, 2011.

LANDRIGAN, P.J.; BOFFETTA, P.; APOSTOLI, P. **The reproductive toxicity and carcinogenicity of lead: a critical review.** Americal Journal of Industrial Medicine, v. 38, p. 231–243, 2000.

LANDSIEDEL, R., KAPP, M.D., SCHULZ, M., WIENCH, K., OESCH, F. **Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations — many questions, some answers.** Mutation Research, v. 681, p. 241–58, 2009.

LANKOFF, A.; BANASIK, A.; DUMA, A.; OCHNIAK, E.; LISOWSKA, H.; KUSZEWSKI, T.; GOZDZ, S.; WOJCIK, A. **A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes.** *Toxicology Letters*, v. 161, p. 27–36, 2006.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research – Reviews in Mutation Research**, v. 544, p. 43–64, 2003.

LEE, K.J.; P.D. NALLATHAMBY, L.M. BROWNING, C.J. OSGOOD, X.H. XU. **In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos.** *ACS Nano*, v. 1, p. 133–143, 2007.

LEE, Y.K.; Y.J. CHOI, E.J. JUNG, H.Q. YIN, J.T. KWON, J.E. KIM, H.T. IM, M.H. CHO, J.H. KIM, H.Y. KIM, B.H. LEE. **Genomics-based screening of differentially expressed genes in the brains of mice exposed to silver nanoparticles via inhalation.** *Journal of Nanoparticle Research*, v. 12, p. 1567–1578, 2010.

LEME, D.M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R.; SEHR, A.; SKERSWETAT, M.; MARCHI, M.R.R.; MACHADO, M.C.; DE OLIVEIRA, D.P.; MARIN-MORALES, M.A. **Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p. 2148–2155, 2011.

LESNIAK, W.; A.U. BIELINSKA, K. SUN, K.W. JANCZAK, X. SHI, J.R. BAKER JR., L.P. BALOGH. **Silver/dendrimer nanocomposites as biomarkers: Fabrication, characterization, in vitro toxicity, and intracellular detection.** *Nano Letters*, v. 5 p. 2123–2130, 2005.

LI, W.; MA, K.K.; SUN, W.; PAUDEL, H.K. **Phosphorylation sensitizes microtubule-associated protein tau to Al⁽³⁺⁾-induced aggregation.** *Neurochemical Research*, v. 23, p. 1467–1476, 1998.

LI, M.; HU, CH.; ZHU, Q.; CHEN, L.; KONG, Z.; LIU, Z. **Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae).** *Chemosphere*, v. 62, p. 565–572, 2006.

LI, M., LIU, Z., XU, Y., CUI, Y., LI, D., KONG, Z. **Comparative effects of Cd and Pb on biochemical response and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta).** *Chemosphere*, v. 74, p. 621–625, 2009.

LIMBACH, L.K.; WICK, P.; MANSER, P.; GRASS, R.N.; BRUININK, A.; STARK, W.J. **Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress.** *Environmental Science and Technology*, v. 41, p. 4158–4163, 2007.

LIONE, A. **The prophylactic reduction of aluminium intake.** *Food Chemistry and Toxicology*, v. 21, p. 103–109, 1983.

LIVINGSTONE, D.R., LEMAIRE, P., MATHEWS, A., PETERS, L., BUCKE, D., LAW, R.J. **Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin -O-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals.** Marine Pollution Bulletin, v. 26, p. 602 – 606, 1993.

LIVINGSTONE, D.R. **The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative difference in biotransformation by invertebrates and fish.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, v. 120, p. 43–49, 1998.

LIVINGSTONE, D.R. **Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms.** Marine Pollution Bulletin, v. 42, p. 656-666, 2001.

LOVERN, S.B.; KLAPER, R. ***Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C₆₀) nanoparticles.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 25, p. 1132-1137, 2006.

LUOMA, S.N.; RAINBOW, P.S. **Metal contamination in aquatic environments: science and lateral management.** Cambridge: Cambridge University Press; 2008.

LUOMA, S.N.; HO, Y.B.; BRYAN, G.W. **Fate, bioavailability and toxicity of silver in estuarine environments.** Marine Pollution Bulletin, v. 31, p. 44–54, 1995.

MAILANDER, V.; LANDFESTER, K. **Interaction of nanoparticles with cells.** Biomacromolecules, v. 10, p. 2379–2400, 2009.

MALLATT, J. **Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review.** Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 42, p. 630–648, 1985.

MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer Nano Series User Manual**, Issue 2.2, Worcestershire-UK, 2005.

MANNA, G.K.; SADHUKHAN, A. **Use of cells of gill and kidney of Tilapia fish in micronucleus test (MNT).** Current Science, v. 55, p. 498-501, 1986.

MANAHAM, S.E. **Environments Chemistry.** 7^a edição. Boca Raton: Lewis, 2000.

MARIN-MORALES, M.A.; LEME, D.M.; MAZZEO, D.E.C. A review of the hazardous effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on living organisms. In: Haines, P.A., Hendrickson, M.D. (Eds.). **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Pollution, Health and Chemistry**, Nova Science Publishers Inc., p. 2-49, 2009.

MARKESBERY, W R., EHNMANN, W D., HOUSSAIN, T. I. M., ALAUDDIN, M. GOODIN, D. T. **Instrumental neutron activation analysis of brain aluminum in Alzheimer disease and aging.** Annals of Neurology, v. 10, p. 511-516, 1981.

MASSARSKY, A.; ABRAHAMA, R.; NGUYEN, K. C.; RIPPSTEIN, P.; TAYABALI, A; TRUDEAU, V. L.; MOON, T. W. **Nanosilver cytotoxicity in rainbow trout**

(*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes and hepatocytes. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, v. 159, p.10–21, 2014.

MAURER-JONES, M.A.; LIN, Y.S.; HAYNES, C.L. **Functional assessment of metal oxide nanoparticle toxicity in immune cells.** ACS Nano, v. 4, p. 3363–3373, 2010.

MAYNARD, A. D. **Nanotechnology: The next big thing, or much Ado about nothing?** The Annals of Occupational Hygiene. v. 51, n. 1, p. 1–12, 2007.

MAZZOLENI, G., DI LORENZO, D., STEIMBERG, N. **Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research?** Genes Nutrition, v. 4 (1), p. 13–22, 2009.

MCCARTY, L.S., HOUSTON, A.H. **Effects of exposure to sublethal levels of cadmium upon water-electrolyte status in the goldfish (*Carassius auratus*).** Journal of Fish Biology, v. 9, p. 11–9, 1975.

McCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. **Biomarkers of environmental contamination.** Lewis, Boca Raton, USA, 1990.

MCDONALD, D.G.; WOOD, C.M. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Rankin JC, Jensen FB, editors. **Fish ecophysiology.** London, UK: Chapman & Hall; p. 297–321, 1993.

MELA, M., RANDI, M.A.F., VENTURA, D.F., CARVALHO, C.E.V., PELLETIER, E., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. **Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 68, p. 426–435, 2007.

MENARD, A., DROBNE, D., JEMEC, A. **Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of *in vivo* data.** Environmental Pollution, v. 159, p. 677–84, 2011.

MERIAN, E. (Ed.). (1991). **Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis and biological relevance.** New York: VCH, Cap. II.

METCALFE, C. D. **Testes for Predicting Carcinogenicity in Fish.** CRC - Critical Reviews in Aquatic Sciences, v. 1, p. 111-129, 1989.

MIGLIORE, L.; COCCHI, L.; NESTI, C.; SABBIONI, E. **Micronuclei assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts.** Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 34, p. 279–284, 1999.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. **Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater.** Mutation Research, v. 367, p. 245-251, 1996.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. **DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring.** Mutation Research, v. 399, p. 135-147, 1998.

MIYAMAE, Y.; YAMAMOTO, M.; SASAKI, Y.F.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI-SOGA, M.; SHIMOI, K.; HAYASHI, M. **Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories.** Mutation Research, v. 418, p. 131-140, 1998.

MOORE, M. **Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?** Environmental International, v. 32, p. 967-976, 2006.

MONTEIRO, M.; QUINTANEIRO, C.; MORGADO, F.; SOARES, A. M. V. M.; GUILHERMINO, L. **Characterization of the cholinesterases present in the head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Application to biomonitoring.** Ecotoxicology and Environmental Safety 1-7, 2004.

MONTEIRO, V.; CAVALCANTE, D.G.S.M.; VILÉLA, M.B.F.A.; SOFIA, S.H.; MARTINEZ, C.B.R. ***In vivo* and *in vitro* exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*.** Aquatic Toxicology, v.104, p.291-298, 2011.

MUDUNKOTUWA, I.A.; GRASSIAN, V.H. **The devil is in the details (or the surface): impact of surface structure and surface energetics on understanding the behavior of nanomaterials in the environment.** Journal of Environmental Monitoring, v. 13, p.1135–1144, 2011.

MURDOCK, R.C., BRADYDICH-STOLLE, L., SCHRAND, A.M., SCHLAGER, J.J., HUSSAIN, S.M. **Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to *in vitro* exposure using dynamic light scattering technique.** Toxicological Sciences, v. 101(2), p. 239–253, 2008.

MUNARI, M.; STURVE, J.; FRENZILLI, G.; SANDERS, M.B. ; CHRISTIAN, P.; NIGRO, M.; LYONS, B.P. **Genotoxic effects of Ag₂S and CdS nanoparticles in blue mussel (*Mytilus edulis*) haemocytes.** Journal of Chemical Ecology, v. 30 (8), p. 719-725, 2014.

NABB, D.L., MINGOIA, R.T., YANG, C.H., HAN, X. **Comparison of basal level metabolic enzyme activities of freshly isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and rat.** Aquatic Toxicology, v. 80, p.52–59, 2006.

NAVARRO, E.; BAUN, A.; BEHRA, R.; HARTMANN, N.B.; FILSER, J.; MIAO, A.J.; QUIGG, E.A.; SANTACHI, P.H.; SIGG, L. **Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi.** Ecotoxicology, v. 17, p.372-386, 2008a.

NAVARRO, E.; PICCAPIETRA, F.; WAGNER, B.; MARCONI, F.; KAEGI, R.; ODZAK, N ; SIGG, L.; BEHRA, R. **Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*.** Environmental Science and Technology, v. 42, p. 8959–8964, 2008b.

NEPOMUCENO, J C; FERRARI, I; SPANÓ, M A; CENTENO, A J. **Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury.** Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 30, p. 293-297, 1997.

NIELSEN, G.; BJERREGAARD, P. **Interaction between accumulation of cadmium and selenium in the tissues of turbot *Scophthalmus maximus***. Aquatic Toxicology, v. 20, p. 253–266, 1991.

NIGRO, M.; FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; GORBI, S.; REGOLI, F. **Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla***. Marine environmental research, v. 54, n. 3-5, p. 517-20, 2002.

NORDBERG, M. **Metallothioneins: historical review and state of knowledge**. Talanta, v. 46, p. 243–254, 1998.

OBERDÖRSTER, E. **Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C₆₀) Induce Oxidative Stress in the brain of Juvenile Largemouth Bass**. Environmental Health Perspectives, v. 112 (10), p. 1058-1062, 2004.

OBERDÖRSTER, G.; MAYNARD, A.; DONALDSON, K.; CASTRANOVA, V.; FITZPATRICK, J.; AUSMAN, K.; CARTER, J.; KARN, B.; KREYLING, W.; LAI, D.; OLIN, S.; MONTEIRO-RIVIERE, N.; WARHEIT, D.; YANG, H. **Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nano materials: elements of a screening strategy**. Particle and Fibre Toxicology, v. 2 (8), p.1-35, 2005.

OBERDÖRSTER, E.; ZHU, S.; BLICKLEY, T. M.; MCCLELLAN-GREEN, P.; HAASCH, M. L. **Ecotoxicology of carbon-based manufactured nanoparticles: effects of fullerene (C₆₀) on aquatic organisms**. Carbon, v. 44, p. 1112–1120, 2006.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. **Concepts of nanoparticles dose metric and response metric**. Environmental Health Perspectives, v. 115, p. 187–194, 2007.

OBERHOLSTER, P.J.; MYBURGH, J.G.; ASHTON, P.J.; COETZEE, J.J.; BOTHA, A.M. **Bioaccumulation of aluminium and iron in the food chain of Lake Loskop, South Africa**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 75, p. 134-141, 2011.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. **Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay**. Radiation Research, v. 122, p. 86 – 94, 1990.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A.; FILIPAK NETO, F.; MELA, M.; SILVA, P.H.; RANDI, M.A.F.; RABITTO, I.S.; ALVES COSTA, J.R.M.; PELLETIER, E. **Hematological finding in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride**. Environmental Research, v. 101, p. 74-80, 2006.

OMURA, T.; SATO, R. **The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes**. Journal of Biological Chemistry, v. 239, p. 2370-2378, 1964.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. **Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells**. Biochemical and Biophysical Research Communications, Orlando, v. 123 (1), p. 291-298, 1984.

- OVREBO, S.; FJELDSTAD, P.E.; GRZYBOWSKA, E.; KURE, E.H; CHORAZY, M.; HAUGEN, A. **Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in a highly polluted area of Poland.** Environmental Health Perspective, v. 103, p. 838-843, 1995.
- OWEN, R.; DEPLEDGE. **Nanotechnology and the environment: risks and rewards.** Marine Pollution Bulletin, v. 50, p. 609-612, 2005.
- OWENS, W.I.; BELCHER, R.V. **A colorimetric micromethod for the determination of glutathione.** Biochemical Journal, v. 94, p. 705–711, 1965.
- OYAKAWA, O. T.; MATTOX, G. M. T. **Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species.** Neotropical. Ichthyology, v. 7 (2), p. 117-140, 2009.
- PACHECO; M.; SANTOS, M. A. **Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.).** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 53, p. 331–347, 2002.
- PAIN, D.J. (1995). Lead in the environment. In: HOFFMAN, D.J. et al. (Ed). **Handbook of Ecotoxicology**, Boca Raton, Lewis, Cap. 16.
- PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. **Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp.** Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 26, p. 345-356, 1995.
- PAPIS, E., DAVIES, S.J., JHA, A.N. **Relative sensitivity of fish and mammalian cells to the antibiotic, trimethoprim: cytotoxic and genotoxic responses as determined by neutral red retention, comet and micronucleus assays.** Ecotoxicology, v. 20, p. 208–217, 2011.
- PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. **Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch).** Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 20, p.112–117, 2005.
- PARK, J.K., LEE, J.S., LEE, H.H., CHOI, I.S., PARK, S.D. **Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced single strand breaks is attributed to slower rejoining processes by DNA polymerase inhibitor, cytosine arabinoside in CHO-K1 cells.** Life Sciences, v. 48, p. 1255–1261, 1991.
- PARK, M.V.D.Z., NEIGH, A.M., VERMEULEN, J.P., DE LA FONTEYNE, L.J.J., VERHAREN, H.W., BRIEDE, J.J., VAN LOVEREN, H., DE JONG, W.H. **The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles.** Biomaterials, v. 32, p. 9810–9817, 2011.
- PATRICK, L. **Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity.** Alternative Medicine Reviews, v. 11, p. 114-127, 2006.

PATTEE, O. H.; PAIN, D. J. **Lead in the environment**. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A. JR.; CAIRNS, J. JR. *Handbook of Ecotoxicology*. Boca Raton, FL, 2 ed., p. 373-408, 2002.

PAYNE, J. F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L. L. **Acetylcholinesterase, and old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland**. *Marine Pollution Bulletin*, v. 32, p. 225-231, 1996.

PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M. D.; PEÑA, J. B. **Fish tolerance to organophosphate induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N acetylcysteine**. *Aquatic Toxicology*, v. 65, p. 337-360, 2003.

PERRY SF, LAURENT P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: Rankin JC, Jensen FB, editors. **Fish ecophysiology**. London, UK: Chapman & Hall; 1993. p. 231-64.

PETERSEN, E.J.; HENRY, T.B. **Methodological considerations for testing the ecotoxicity of carbon nanotubes and fullerenes: Review**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 31, p. 60-72, 2012.

PEURANEN, S.; VUORINEN, P.J.; VUORINEN, M.; HOLLENDER, A. **The effects of iron, humic acids and low pH on the gills and physiology of brown trout, *Salmo trutta***. *Annales Zoologici Fennici*, v. 31, p. 389-96, 1994.

PICCAPIETRA, F.; SIGG, L.; BEHRA, R. **Colloidal stability of carbonate coated silver nanoparticles in synthetic and natural freshwater**. *Environmental Science and Technology*, v.46, p.818-825, 2012.

PLANQUETTE, P.; KEITH, P.; LE BAIL, P.Y. Atlas des poissons d'eau douce de Guyane (tome 1). **Collection du Patrimoine Naturel**, IEGB-M.N.H.N., INRA, CSP, Min. Env., v.22, p.166, 1996.

PRETTO, A.; LORO, V. L.; MORSCH, V. M.; MORAES, B. S.; MENEZES, C.; CLASEN, B.; HOEHNE, L.; DRESSLER, V. **Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium**. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 58, n. 4, p. 1008-1014, 2010.

PYLE, G.G.; SWANSON, S.M.; LEHMKUHL, D.M. **The influence of water hardness, pH, and suspended solids on nickel toxicity to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*)**. *Water Air and Soil Pollution*, v.133, p. 215-26, 2002.

RABITTO, I. S., ALVES COSTA, J. R. M., SILVA DE ASSIS, H. C., PELLETIER, E., AKAISHI, F. M., ANJOS, A., et al. **Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 60(2), p. 147-156, 2005.

RAISUDDIN, S., JHA, A.N. **Relative sensitivity of fish and mammalian cells to sodium arsenate and arsenite as determined by alkaline single-cell gel electrophoresis and cytokinesis-block micronucleus assay**. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 44, p. 83-89, 2004.

RAMSDEN, C.S.; SMITH, T.J.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. **Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain.** Ecotoxicology, v. 18, p. 939–951, 2009.

RAMSDORF, W.A; FERRARO, M.V.M; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A; COSTA, J.R.M; CESTARI, M.M. **Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*.** Environmental Monitoring and Assessment, v. 158 (1-4), p. 77-85, 2009.

RAMSDORF, W.A, GUIMARÃES, F.S.F; FERRARO, M.V.M.; GABARDO, J; TRINDADE, E. S; CESTARI, M.M. **Establishment of Experimental Conditions for Preserving Samples of Fish Blood for Analysis with both Comet Assay and Flow Cytometry.** Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 673 (1), p. 78-81, 2008.

RANA, V.S.S. **Metals and apoptosis: Recent developments.** Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, v. 22, p. 262–284, 2008.

REJMAN, J., OBERLE, V., ZUHORN, I.S., HOEKSTRA, D. **Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae- mediated endocytosis.** Biochemical Journal, v. 377, p. 159–169, 2004.

Reeves, J. F.; Davies, S. J. ; Dodd, N. J. F.; Jha, A. N. **Hydroxyl radicals (.OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells.** Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 640, p. 113–122, 2008.

RIOL, M.J.M.; VALIÑAS, M.C.N.; FRENÁNDEZ, M.A.G.; LÓPEZ, M.P. **Glutathione S transferases from rainbow liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization.** Comparative Biochemistry and Physiology, part C, v. 128 (2), p. 227-235, 2001.

RIOS, F. S.; OBA, E. T.; FERNANDES, M. N.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. **Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae).** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, v. 140, p. 281–287, 2005.

ROBICHAUD, C.O., UYAR, A.E., DARBY, M.R., ZUCKER, L.G., WIESNER, M.R. **Estimates of Upper Bounds and Trends in Nano-TiO₂ Production As a Basis for Exposure Assessment.** Environmental Science and Technology, v. 43 (12), p. 4227– 4233, 2009.

ROCCO, L.; FRENZILLI, G.; FUSCO, D.; PELUSO, C.; STINGO, V. **Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 73 (7), p. 1530-6, 2010.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. **Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications.** Journal of Chromatography, part B, v. 722, p. 225-254, 1999.

- ROSENMAN, K.D.; MOSS, A.; KON, S. **Argyria: clinical implications of exposure to silver nitrate and silver oxide.** Journal of Occupational and Environmental Medicine; v. 21, p. 430–435, 1979.
- ROSSI, G., BARNOUD, J., MONTICELLI, L. **Polystyrene nanoparticles perturb lipid membranes.** The Journal of Physical Chemistry Letters, v. 5, p. 241–246, 2014.
- ROY, A.K., SHARMA, A., TALUKDER, G. **A time-course study on effects of aluminium on mitotic cell division in *Allium sativum*.** Mutation Research, v. 227, p. 221–226, 1989.
- ROYSET, O.; ROSSELAND, B.O.; KRISTENSEN, T.; KROGLUND, F.; GARMO, O.A.; STEINNES, E. **Diffusive gradients in thin films sampler predicts stress in brown trout (*Salmo trutta* L.) exposed to Al in acid fresh waters.** Environmental Science and Technology, v. 39, p. 1167–1174, 2005.
- SAMALI, A.; COTTER, T.G. **Heat shock proteins increase resistance to apoptosis.** Experimental Cell Research, v. 223, p. 167–170, 1996.
- SÁNCHEZ-FORTÚN, S., LLORENTE, M. T. AND CASTAÑO, A. **Genotoxic effects of selected biocides on RTG-2 fish cells by means of a modified Fast Micromethod Assay.** Aquatic Toxicology, v. 73, p. 55–64, 2005.
- SANCHEZ-GALAN, S; LINDE, A. L; GARCIA-VAZQUEZ, E. **Brown Trout and European Minnow as Target Species for Genotoxicity Tests: Differential Sensitivity to Heavy Metals.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 43, p. 301–304, 1999.
- SANCHEZ, W., PALLUEL, O., MEUNIER, L., COQUERY, M., PORCHER, J.-M., AÏT-AÏSSA, S. **Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels.** Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 19, p. 177–183, 2005.
- SANCHEZ, V.C.; JACKHAK, A.; HURT, R.H.; KANE, A.B. **Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review.** Chemical Research in Toxicology, v. 25(1), p. 15–34, 2011.
- SANDERS, M.B., SEBIRE, M., STURVE, J., CHRISTIAN, P., KATSIADAKI, I., LYONS, B.P., et al. **Exposure of sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) to cadmium sulphide nanoparticles: biological effects and the importance of experimental design.** Marine Environmental Research, v. 66, p. 161–163, 2008.
- SARASQUETE, C.; SEGNER, H. **Cytochrome P4501A in teleostean fishes: A review of immunohistochemical studies.** Science of the Total Environment, v. 247, p. 313–332, 2000.
- SASAKI, Y.F.; TSUDA, S.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E. **Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay.** Mutation Research, v. 388, p. 33–44, 1997.
- SAWOSZ, E.; BINEK, M.; GRODZIK, M.; ZIELINSKA, M.; SYSA, P.; SZMIDT, M.; NIEMIEC, T.; CHWALIBOG, A. **Influence of hydrocolloid silver nanoparticles on**

gastrointestinal microflora and morphology of enterocytes of quails. Archives of Animal Nutrition; v. 61, p. 444–51, 2007.

SCHLENK, D. Biotransformation in Fishes. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. **The toxicology of fishes.** USA: CRC press, p.153-234, 2008

SCHRAND, A.M.; RAHMAN, M.F.; HUSSAIN, S.M.; SCHLAGER, J.J.; SMITH, D.A.; SYED, A.F. **Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment.** Nanomedicine and Nanobiotechnology, v. 2, p. 544–568, 2010.

SCHMID, W. **The micronucleus test.** Mutation Research, v. 31, p. 9-15, 1975.

SCHOLZ, S., SELA, E., BLAHA, L., BRAUNBECK, T., GALAY-BURGOS, M., GARCÍA-FRANCO, M., GUINEA, J., KLÜVER, N., SCHIRMER, K., TANNEBERGER, K., et al. **A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 67, p. 506–530, 2013.

SCHULTZ, A.G.; ONG, K.J.; MACCORMACK, T.; MA, G.B.; VEINOT, J.G.C.; GOSS, G.G. **Silver nanoparticles inhibit sodium uptake in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Environmental Science and Technology, v. 46, p. 10295–10301, 2012.

SCOWN, T. M.; VAN AERLE, R.; JOHNSTON, B. D.; CUMBERLAND, S.; LEAD, J. R.; OWEN, R.; TYLER, C. R. **High doses of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles accumulate in the kidneys of rainbow trout but with no observable impairment of renal function.** Toxicological Sciences, v. 109, p. 372–380, 2009.

SCOWN, T.M.; E.M. SANTOS, B.D. JOHNSTON, B. GAISER, M. BAALOUSHA, S. MITOV, J.R. LEAD, V. STONE, T.F. FERNANDES, M. JEPSON, R. VAN AERLE, C.R. TYLER. **Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout.** Toxicological Sciences, v. 115, p. 521-534, 2010.

SEARLE, J.; KERR, J. F.; BISHOP, C. J. **Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance.** Pathology Annual, v.17 (2), p. 229-59, 1982.

SEGNER, H., CRAVEDI, J. P. **Metabolic activity in primary cultures of fish hepatocytes.** Alternative Laboratory Animals, v. 29, p. 251-257, 2001.

SERRANO-GARCIA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. **Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events.** Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 38 (1), p. 38–45, 2001.

SESTILI, P.; CANTONI, O. **Osmotically driven radial diffusion of single-stranded DNA fragments on an agarose bed as a convenient measure of DNA strand scission.** Free Radicals Biol. Med., v. 26, p. 1019–1026, 1999.

SESTILI, P.; MARTINELLI, C.; STOCCHI, V. **The fast halo assay: an improved method to quantify genomic DNA strand breakage at the single-cell level.** Mutation Research, v. 607, p. 205–14, 2006.

SHAONAN, L.; XIANCHUAN, X.; GUONIAN, Z.; YAJUN, T. **Kinetic characters and resistance to inhibition of crude and purified brain acetylcholinesterase of three freshwater fishes by organophosphates.** Aquatic Toxicology, v. 68, p. 293-299, 2004.

SHAW, B. J.; HANDY, R. D. **Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions.** Environment International, v. 37(6), p. 1083-1097, 2011.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G.M. **Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S-phase.** The Journal of Cell Biology, v. 140, p. 1307–1320, 1998.

SHIMIZU, N.; SHIMURA, T.; TANAKA, T. **Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei.** Mutation Research. v. 448, p. 81 90, 2000.

SHINOHARA, N., MATSUMOTO, K., ENDOH, S., MARUM J., NAKANISHI, J. **In vitro and in vivo genotoxicity tests on fullerene C₆₀ nanoparticles.** Toxicology Letters, v. 191, p. 289–296, 2009.

SILBERGELD, E.K. **Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen.** Mutation Research, v. 533, p. 121–33, 2003.

SILVA DE ASSIS, H. C. **Der Einsatz Von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen.** Alemanha. Universidade Técnica de Berlim, 1998.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. **A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells.** Experimental Cell Research, v. 175, p. 184-191, 1988.

SINGH, N. P. **A simple method for accurate estimation of apoptotic cells.** Experimental Cell Research, v. 256 (1), p. 328-37, 2000.

SINGH, N. P. **Apoptosis Assessment by the DNA Diffusion Assay.** Methods in Molecular Medicine, v. 111, p. 55-67, 2005.

SINHA, S.; MALLICK, S.; MISRA, R.K.; SINGH, S.; BASANT, A.; GUPTA, A.K. **Uptake and translocation of metals in Spinacia oleracea L. grown on tannery sludge amended and contaminated soils: effect on lipid peroxidation, morphoanatomical changes and antioxidants.** Chemosphere, v. 67, p. 176–187, 2007.

SIRIMUTHU, N.M.; C.D. SYME, J.M. COOPER. **Monitoring the uptake and redistribution of metal nanoparticles during cell culture using surface-enhanced Raman scattering spectroscopy.** Analytical Chemistry, v. 82, p. 7369–7373, 2010.

SJÖGREN, B.; IREGEN, A.; ELINDER, C.G.; YOKEL, R.A. Chapter 17: Aluminium. In: **Handbook of toxicology of metals**, Ed. Nordberg, M.; Nordberg, G.F.; Fowler, B.A.; Friberg, L. Academic Press, 3rd edition, 2007.

SMITH, I.R. **Erythrocytic micronuclei in wild fish from Lakes Superior and Ontario that have pollution-associated neoplasias**. Journal of Great Lakes Research, v. 16, p. 139–142, 1990.

SMITH, C.J.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. **Toxicity of single walled carbon nanotubes on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects**. Aquatic Toxicology, v. 82, p. 94–109, 2007.

SOARES, M.G.M.; ALMEIDA, R. G; E TUNK, W.T. **The trophic status of the fish fauna in Lago Camaleao, a macrophyte dominated floodplain lake in the middle Amazon**. Amazoniana. v. IX(4), p. 511 – 526, 1986.

SOLÉ, M.; PORTE, C.; ALBAIGÉS, J. **Seasonal variation in mixed function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis***. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 14, p. 157–164, 1995.

SORENSEN, J. R. J.; CAMPBELL, I. R.; TEPPER, L. B.; LINGG, R. D. **Aluminum in the environment and human health**. Environmental Health Perspective, v. 8, p. 3–95, 1974.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. **The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay)**. Mutagenesis, v. 10, p. 555–559, 1995.

SPIVEY, A. **The weight of lead. Effects add up in adults**. Environmental Health Perspective, v. 115, p. 31–36, 2007.

STACCHIOTTI, A.; RODELLA, L.F.; REZAN, R.; LAVAZZA, A.; BIANCHI, R. **Stress proteins expression in rat kidney and liver chronically exposed to aluminium sulphate**. Histology. Histopathology, v. 21, p. 131–140, 2006.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrle, P.M. Jr.; Bergman, H.L. Biomarkers. **Biochemical, Physiological, and Histological markers of antropogenic stress**. Eds. Lewis Publishers, p. 235–334, 1992.

STONE, V., NOWACK, B., BAUN, A., VAN DEN BRINK, N., VON DER KAMMER, F., DUSINSKA, M., HANDY, R., HANKIN, S., HASSELLÖV, M., JONER, E.; FERNANDES, T. F. **Nanomaterials for environmental studies: classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation**. Science of the Total Environment, v. 408, p. 1745–1754, 2010.

STOREY, K.B. **Oxidative stress: animal adaptations in nature**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 29(12), p. 1715–1733, 1996.

STOTT, L C.; SCHNELL, S.; HOGSTRAND, C.; OWEN, S F.; BURY, N R. **A primary fish gill cell culture model to assess pharmaceutical uptake and efflux: Evidence for passive and facilitated transport.** *Aquatic Toxicology*, v. 159, p. 127–137, 2015.

STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H. C., HANSEN, P. D. **Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination.** *Marine Environmental Research*. v. 47, p. 1-10. 1999.

STURM, A.; WOGRAM, J.; SEGNER, H.; LIESS, M. **Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 19, p. 1607- 1615, 2000.

SUIÇMEZ, M.; KAYIM, M., KÖSEOĞLU, D., HASDEMİR, E. **Toxic effects of lead on the liver and gills of *Onchorhyncus mykiss* WALBAUM 1792.** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 77, p. 551-558, 2006.

SUGIHARA, T; SAWADA, S; HAKURA, A; HORI, Y; UCHIDA, K; SAGAMI, F. **A staining procedure for micronucleus test using new methylene blue and acridine orange: specimens that are supravitaly stained with possible long-term storage.** *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 470, p. 103–108, 2000.

SUN, H. W.; ZHANG, X. Z.; NIU, Q.; CHEN Y. S.; CRITTENDEN, J. C. **Enhanced accumulation of arsenate in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles.** *Water Air and Soil Pollution*, v. 178, p. 245–254, 2007.

SUZUKI, Y.; NAGAE, Y.; LI, J.; SABAKA, H.; MAZOWA, K.; TAKAHASHI, A.; SHIMUZU, H. **The micronucleus test and erythropoiesis: effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio).** *Mutagenesis*, v. 4, p. 420–424, 1989.

TAO, S., LIU, C., DAWSON, R., CAO, J., LI, B. **Uptake of particulate lead via the gills of fish (*Carassius auratus*).** *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 37, p. 352–357, 1999.

TAPIA, J., DURAN, E., PENA-CORTES, F., HAUENSTEIN, E., BERTRAN, C., SCHLATTER, R. ***Micropogonias manni* as a bioindicator for copper in Lake Budi (IX Region, Chile).** *Journal of the Chilean Chemical Society*, v. 51, p. 901–904, 2006.

TAJU, G.; ABDUL MAJEED, S.; NAMBI, K.S.N.; SAHUL HAMEED, A.S. **In vitro assay for the toxicity of silver nanoparticles using heart and gill cell lines of *Catla catla* and gill cell line of *Labeo rohita*.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 161, p. 41–52, 2014.

TAYLOR, E.W., BEAUMONT, M.W., BUTLER, P.J., MAIR, J., MUJALLID, M.S.I. **Lethal and sub-lethal effects of copper upon fish: a role for ammonia toxicity?** In: Taylor EW, editor. *Toxicology of aquatic pollution: physiological, cellular and molecular approaches*. Society for Experimental Biology Seminar series, Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1996. p. 86-113.

TEPE, Y., TURKMEN, M., TURKMEN, A. **Assessment of heavy metals in two commercial fish species of four Turkish seas.** Environmental and Monitoring Assessment, v. 146, p. 277–284, 2007.

TEW, K. D.; RONAI, ZE'EV. **GST function in drug and stress response.** Drug Resistance Updates, v. 2, p. 143–147, 1999.

THOMAS, K.V.; FARKAS, J.; FARMEN, E.; CHRISTIAN, P.; LANGFORD, K.; WU, Q.; TOLLEFSEN, K.E. **Effects of dispersed aggregates of carbon and titanium dioxide engineered nanoparticles on rainbow trout hepatocytes.** Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, v. 74, p. 466–477, 2011.

TOLBERT, P.E., SHY, C.M., ALLEN, J.W. **Micronuclei and other nuclear abnormalities in buccal smears: methods and development.** Mutation Research, v. 271, p. 69–77, 1992.

TOLLEFSEN, K. E., BRATSBERG, E., BOYUM, O., FINNE, E. F., GREGERSEN, I. K., HEGSETH, M., SANDBERG, C.; HYLLAND, K. **Use of fish in vitro hepatocyte assays to detect multi-endpoint toxicity in Slovenian river sediments.** Marine Environmental Research, v. 62, p. S356–S359, 2006.

TRAUB, R. D.; RAINS, T. C.; GARRUTO, R. M.; GAJDUSEK, D. C.; GIBBS, C. J. Jr. **Brain destruction alone does not elevate brain aluminum.** Neurology, v. 31, p. 986–990, 1981.

TÜRKMEN, A., TÜRKMEN, M., TEPE, Y., MAZLUM, Y., OYMAEL, S. **Heavy metal levels in Blue Crab (*Callinectes sapidus*) and Mullet (*Mugil cephalus*) in Iskenderun Bay (North Eastern Mediterranean, Turkey).** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 77, p. 186–193, 2006.

TÜRKMEN, M., TÜRKMEN, A., TEPE, Y., TÖRE, Y., ATES, A. **Determination of metals in fish species from Aegean and Mediterranean seas.** Food Chemistry, v. 108, p. 794–800, 2008.

UCHEA, C., SARDA, S., SCHULZ-UTERMOEHL, T., OWEN, S., CHIPMAN, K.J. **In vitro models of xenobiotic metabolism in trout for use in environmental bioaccumulation studies.** Xenobiotica, v. 43 (5), p. 421–431, 2013.

UCHEA, C.; OWEN, S.F.; CHIPMAN, J.K. **Functional xenobiotic metabolism and efflux transporters in trout hepatocyte spheroid cultures.** Toxicology Research, v. 4, p. 494–507, 2015.

UCHINO, T.; TOKUNAGA, H.; ANDO, M.; UTSUMI, H. **Quantitative determination of OH radical generation and its cytotoxicity induced by TiO₂-UVA treatment.** Toxicology in Vitro, v. 16, p. 629–635, 2002.

UEDA, T.; HAYASHI, M.; KOIDE, N.; SOFUNI, T., KOBAYASHI, J. **A preliminary study of the micronucleus teste by acridine orange fluorescent staining compared with cromossomal aberration teste using fish erythropoietic and embrionic cells.** Water Science and Technology, v. 25, p. 235–240, 1992.

UDROIU, I. **The micronucleus test in piscine erythrocytes.** *Aquatic Toxicology*, v.79, p. 201-204, 2006.

UNO, T.; ISHIZUKA, M.; ITAKURA, T. **Cytochrome P450 (CYP) in fish.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 34, p. 1-13, 2012.

USEPA. **EPA's Terms of Environment.** United States Environmental Protection Agency, Washington- DC, 2006.

VALE, J. A. **Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning.** *Toxicology Letters*, v. 102-103, p. 649-652, 1998.

VAN DER OOST, R; BEYER, J; VERMEULEN, NPE. **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57-149, 2003.

VERSTRAETEN, S.V.; AIMO, L. **Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity.** *Archives of Toxicology*, v. 82, p. 789–802, 2008.

VEVERS, W.F., JHA, A.N. **Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells in vitro.** *Ecotoxicology*, v. 17, p. 410-420, 2008.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. **A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs.** *Marine Environmental Research*, v. 44 (1), p. 69–84, 1997.

VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; CERATTO, N.; PANFOLI, I. **Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview.** *Cellular and Molecular Biology*, v. 46, p. 407-417, 2000.

VICARI, T.; FERRARO, M.V.M.; RAMSDORF, W.A.; MELA, M.; RIBEIRO, C.A.O.; CESTARI, M.M. **Genotoxic evaluation of different doses of methylmercury (CH₃Hg⁺) in *Hoplias malabaricus*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 82, p.47–55, 2012.

VIEIRA, L.R., GRAVATO, C., SOARES, A.M.V.M., MORGADO, F., GUILHERMINO, L. **Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour.** *Chemosphere*, v. 76 (10), p. 1416–1427, 2009.

VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M.J.; VALAVANIDIS, A. **Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece.** *Marine Pollution Bulletin*, v. 54, p. 1361–1371, 2007.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology.** Taylor & Francis, Bristol, PA 1996.

WANG, J.; ZHOU, G.; CHEN, C.; YU, H.; WANG, T.; MA, Y.; JIA, G.; GAO, Y.; LI, B.; SUN, J.; LI, Y.; JIAO, F.; ZHAO, Y.; CHAI, Z. **Acute toxicity and biodistribution of**

different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. Toxicology Letters, v.168, p.176–185, 2007.

WARD, J.S.R.; MCCROHAN, R.C.; WHITE, N.K. **Influence of aqueous aluminium on the immune system of the freshwater crayfish *Pacifasticus leniusculus*.** Aquatic Toxicology, v. 77, p. 222–228, 2006.

WARHEIT, D.B.; BROCK, W.J.; LEE, W.J.; WEBB, K.P.; REED, K.L. **Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity.** Toxicological Sciences, v. 88, p. 514–524, 2005.

WARHEIT, D.B.; WEBB, T.R.; SAYES, C.M.; COLVIN, V.L.; REED, K.L. **Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area.** Toxicological Sciences, v. 91, p. 227–236, 2006.

WARHEIT, D.B.; HOKE, R.A.; FINLAY, C.; DONNER, E.M.; REED, K.L.; SAYES, C.M. **Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management.** Toxicology Letters, v. 171, p. 99–110, 2007.

WAUER, G.; HECKEMANN, H.; KOSCHEL, R. **Analysis of toxic aluminium species in natural waters.** Microchimica Acta, v. 146, p. 149–154, 2004.

WEATHERUP, R.N.; MCCracken, K.J. **Comparison of estimates of digestibility of two diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), using two markers and two methods of faeces collection.** Aquaculture Research, v. 29, p. 527–533, 1998.

WILLIAMS, R.C.; METCALFE, C.D. **Development of an *in vitro* hepatic micronucleus assay with rainbow trout.** Aquatic Toxicology, v. 23, p. 193–202, 1992.

WREN, C.D.; HARRIS, S.; HARTTRUP, N. Ecotoxicology of mercury and cadmium In: HOFFMAN, D.J. et al. (Ed). **Handbook of Ecotoxicology**, Boca Raton, Lewis, cap.17, 1995.

WINTER, M.J., ELLIS, L.C.J., HUTCHINSON, T.H. **Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mytomycin C or cyclophosphamide.** Mutation Research, v. 629, p. 89–99, 2007.

WISE SR., J.P.; GOODALE, B.C.; WISE, S.S.; CRAIG, G.A.; PONGAN, A.F.; WALTER, R.B.; THOMPSON, W.D.; NG, A.K.; ABOUEISSA, A.M.; MITANI, H.; SPALDING, M.J.; MASON, M.D. **Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells.** Aquatic Toxicology, v. 97, p. 34–41, 2010.

WOOD, C. M., HOGSTRAND, C., GALVEZ, F., MUNGER, R. S. **The physiology of waterborne silver toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The effects of ionic Ag⁺.** Aquatic Toxicology, v. 35, p. 93–109, 1996.

WU, Y.; Q. ZHOU, H. LI, W. LIU, T. WANG, G. JIANG. **Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test.** Aquatic Toxicology, v. 100, p. 160–167, 2010.

Woodrow Wilson Center for scholars, 2011. **The Project on Emerging Nanotechnologies, Washington, USA.** Available at:
<http://www.nanotechproject.org/index.php?id=44&action=view>

XIAO, R., YU, H.L., ZHAO, H.F., LIANG, J., FENG, J.F., WANG, W. **Developmental neurotoxicity role of cyclophosphamide on post- neural tube closure of rodents *in vitro* and *in vivo*.** International Journal of Developmental Neuroscience, v. 25, p. 531–537, 2007.

XIONG, D.W.; FANG, T.; YU, L.; SIMA, X.; ZHU, W. **Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage.** Science of the Total Environment, v. 409, p. 1444–1452, 2011.

XU, J., MA, M., PURCELL, W.M. **Characterisation of some cytotoxic endpoints using rat liver and HepG2 spheroids as *in vitro* models and their application in hepatotoxicity studies. II. Spheroid cell spreading inhibition as a new cytotoxic marker.** Toxicology and Applied Pharmacology, v. 189, p. 112–119, 2003.

XU, A., CHAI, Y., NOHMI, T., HEI, T.K. **Genotoxic responses to titanium dioxide nanoparticles and fullerene in gpt delta transgenic MEF cells.** Particle and Fibre Toxicology, v. 6 (3), 2009.

YEO, M.K.; KANG, M. **Effects of nanometer sized silver materials on biological toxicity during zebrafish embryogenesis.** Bull. Korean Chem. Soc, v. 29, p. 1179–1184, 2008.

YENDLE, J. E.; TINWELL, H.; ELLIOT, B. M.; ASHBY, J. **The genetic toxicity of time: Importance of DNA – unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays.** Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 375, p.125-136, 1997.

YOUSEF, M.I. **Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid.** Toxicology, v. 199, p. 47–57, 2004.

YUE, Y.; BEHRA, R.; SIGG, L.; FREIRE, P.F.; PILLAI, S.; SCHIRMER, K. **Toxicity of silver nanoparticles to a fish gill cell line: Role of medium composition.** Nanotoxicology, v. 9 (1), p. 54-63, 2015.

ZATTA, P., KISS, T., SUWALSKY, M., BERTHON, G. **Aluminium (III) as a promoter of cellular oxidation.** Coordination Chemistry Reviews, v. 228, p. 271–284, 2002.

ZHANG, X.; SUN, H.; ZHANG, Z.; NIU, Q.; CHEN, Y.; CRITTENDEN, J.C. **Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles.** Chemosphere, v. 67. p. 160–166. 2007.

ZHU, X.; ZHU, L.; DUAN, Z.; QI, R.; LI Y.; LANG, Y. **Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage.** Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/ Hazardous Substances and Environmental Engineering; v. 15, p.278–84, 2008.

ZHU, X.; CHANG, Y.; CHEN, Y. **Toxicity and Bioaccumulation of TiO₂ Nanoparticle Aggregates in *Daphnia magna*.** Chemosphere, v. 78, n.3, p. 209–215, 2010.

ZHU, X.; WANG, J.; ZHANG, X.; CHANG, Y.; CHEN, Y. **Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain.**Chemosphere, v.79, p. 928-933, 2010.

ZUCCO, F., ANGELIS, I., TESTAI, E., STAMMATI. **Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after.** Toxicology in Vitro, v. 18, p.153–163, 2004.